

**FABÍOLA CARINA BILUCA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E INFLUÊNCIA DO  
TRATAMENTO TÉRMICO EM MÉIS DE ABELHA SEM  
FERRÃO (*Meliponinae* spp.) PRODUZIDOS NO ESTADO DE  
SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roseane Fett

**FLORIANÓPOLIS  
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Biluca , Fabíola Carina  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO  
TÉRMICO EM MÉIS DE ABELHA SEM FERRÃO (Meliponinae spp.)  
PRODUZIDOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA / Fabíola Carina  
Biluca ; orientador, Roseane Fett Fett - Florianópolis,  
SC, 2014.  
110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Mel. 3. Abelha sem ferrão  
. 4. Tratamento térmico . 5. Caracterização química . I.  
Fett, Roseane Fett. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, ao senhor meu Deus, que esteve ao meu lado durante toda a minha caminhada. Agradeço por me proteger, guiar e abençoar.

Agradeço especialmente aos meus pais, Agostinho e Classi, pelo grande amor recebido e ensinado, pela dedicação, carinho, cuidados e educação, e principalmente, por sempre acreditarem em mim e me dar todo o apoio necessário para nunca desistir. Agradeço as vozes que me tranquilizam o coração e pelos abraços de saudade. Apesar de longe estou sempre pensando em vocês, me esforçado e me dedicando cada dia mais para dar alegrias a vocês. O meu sorriso... devo a vocês. Amo-os!

Aos meus irmãos Francis e Leonela, meus companheiros fiéis e confidentes de minha vida, agradeço por sempre estarem ao meu lado me rodeando de carinho. Amo muito vocês!

A toda minha gigante e maravilhosa família por rezarem, torcerem e se orgulharem sempre de mim. Obrigada!

A professora Dra. Roseane Fett, minha orientadora, pela confiança, apoio e oportunidade em participar do seu grupo de pesquisa.

Aos profissionais do grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Alimentos (LabQA), as professoras; Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa, Dra. Graciele da Silva Campelo Borges, Dra. Heloisa Maltez e ao Professor Dr. Luciano Vitali. Agradeço por torcerem por minhas conquistas no decorrer do mestrado, pelas vezes em que me ouviram, pelas sugestões dadas, pelas palavras certas, pelos ensinamentos passados, os quais sei que vou lembrar sempre. Agradeço, por nesse curto período de tempo, terem se dedicado um pouquinho ao meu trabalho, cada um como um equipamento analítico me apresentaram uma vasta gama de conhecimentos, idéias e sugestões.

Um agradecimento mais que especial ao Luciano Gonzaga por toda sua dedicação e paciência, pelo seu enorme conhecimento transmitido, pelas suas idéias, contribuições e a participação fundamental para o

desenvolvimento deste trabalho de pesquisa. Obrigada por acreditar e confiar em mim e nessa pesquisa. Você é uma pessoa iluminada!

Agradeço as princesas e os príncipes do Laboratório de Química de Alimentos (LabQA), pela colaboração, amizade e a descontração na rotina do dia-a-dia: Andressa, Mônia, Renata, Mayara, Cony, Samuel e Ismael. Agradeço as lindas Isis, Lais e Gabriela, estagiárias do laboratório, que me ajudaram muito na realização prática deste trabalho. Agradeço em especial as minhas princesas, Fabiana e Priscila, que contribuíram não somente no meu trabalho, mas na minha vida dentro e fora da universidade, obrigada pela amizade, conversas, conselhos e risadas. Agradeço a Deus por colocar pessoas como vocês em minha vida, para aprender a ter irmãos de coração, amar e respeitar. Amo vocês!

A todos os meus amigos que caminharam junto comigo e fazerem minha vivência em Florianópolis mais fácil: Saionara, Carolina, Laura, Amélia, Leonardo, Tiago, Paulo, Japa, Lucas, Cristian, Raphael e Victor. Aos amigos que mesmo longe mandam sempre energias boas para que eu continuasse: Jéssica, Ale, Julia, Nathi, Duh, Ellen, Igor, Dani. Obrigada pela cumplicidade, amizade, companheirismo, alegrias, risadas, estádias, por toda ajuda em qualquer situação, enfim, por todos os momentos vividos intensamente.

Aos meliponicultores pelo fornecimento das amostras de mel de abelhas sem ferrão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório do Departamento de Ciência de Alimentos - FEA/UNICAMP- Campinas - SP.

"Não receie crescer lentamente, só tenha medo de permanecer imóvel..."

*Autor desconhecido*



## RESUMO

BILUCA, Fabíola Carina. **Caracterização química e influência do tratamento térmico em méis de abelha sem ferrão (*Meliponinae* spp.) produzidos no Estado de Santa Catarina.** 2014. 110p. Dissertação (Mestrado Ciências dos alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

O mel de abelha sem ferrão (*Meliponinae* spp.) é um produto com características particulares e de sabor exótico, que é, há muitos anos utilizado pela população. Apesar dessa cultura envolvendo o mel, poucos estudos têm sido realizados para avaliar seu verdadeiro potencial. Com o propósito de buscar novos dados e auxiliar nas pesquisas científicas em relação ao mel de abelhas sem ferrão, este estudo objetivou avaliar as características de identidade e qualidade, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de amostras de mel de abelha sem ferrão produzidos no Estado de Santa Catarina, na safra de 2012/2013, e avaliar alguns parâmetros de validação das metodologias de determinação de 5-hidroximetilfurfural (HMF) e açúcares, antes e após o tratamento térmico. As amostras analisadas demonstraram que, as exigências estabelecidas pela legislação brasileira de *Apis mellifera*, não atendem na totalidade as características de identidade e qualidade dos méis de abelha sem ferrão, os quais apresentaram níveis de umidade que variam de 23,02 a 34,11% (m/m), acidez de 36,45 a 138,46 meq kg<sup>-1</sup>, pH de 3,73 a 5,31, atividade diastásica de <3 a 49,54 un. Göthe, condutividade elétrica de 0,15 a 1,34 mS cm<sup>-1</sup>, açúcares como a frutose 31,11 - 40,20 % (m/m) e glicose 8,20 a 30,98% (m/m), já para sacarose e 5-HMF os teores foram abaixo dos limites que quantificação (LOQ= 0,074 e 0,31 mg L<sup>-1</sup> respectivamente). Quando avaliados o conteúdo de compostos fenólicos totais (14,69 a 98,04 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) e atividade antioxidante (DPPH - 3,23 a 18,57 mg EAA 100 g<sup>-1</sup>, FRAP - 64,00 a 666,66 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup>, ORAC - 199,16 a 624,48 µmol TE 100g<sup>-1</sup>), podemos destacar que os mesmos são semelhantes aos encontrados na literatura para méis de *Apis mellifera*. Os parâmetros de validação avaliados utilizando eletroforese capilar apresentaram resultados analíticos adequados para as análises de 5 - HMF e açúcares nos méis de abelhas sem ferrão. Com relação aos resultados do estudo do tratamento térmico os méis de abelha sem ferrão apresentaram níveis de 5 - HMF elevados (238,18 mg kg<sup>-1</sup>), apenas

quando temperaturas extremas foram empregadas (75, 85 e 95 °C). Além disso, o mel de abelha sem ferrão apresenta níveis de 5 - HMF três vezes menores quando submetido a mesmas condições extremas de tratamento térmico do mel de *Apis mellífera*. Os resultados ainda sugerem que um tratamento térmico breve com temperaturas elevadas pode ser uma maneira eficaz de aumentar a vida de prateleira do mel de abelhas sem ferrão sem afetar o conteúdo de 5 - HMF. As diferenças representativas quanto aos teores de 5 - HMF entre os dois tipos de mel indicam a necessidade de parâmetros de identidade e qualidade específicos para o mel de abelha sem ferrão, a fim de atender as particularidades do mel e dar subsídio para a comercialização legal desse mel de qualidade diferenciado.

**Palavras-chave:** Abelhas sem ferrão. Mel. Composição. Eletroforese capilar. Tratamento térmico.



## ABSTRACT

The honey from stingless bee (*Meliponinae* spp.) is a product with specific characteristics and exotic flavor, which has been used for many years by the population with therapeutic purposes. Although this culture involving honey, few studies have been conducted to assess its true potential. In order to search for new data and support scientific research in relation to honey of stingless bees, this study aimed to evaluate the characteristics of identity and quality, total phenolic compounds and antioxidant activity of honey samples of stingless bee produced in the State of Santa Catarina in harvest 2012/2013 and to partially validate for this matrix methods to determine 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and sugars (fructose, glucose and sucrose) before and after the heat treatment. The samples analyzed showed that the requirements established by Brazilian legislation of *Apis mellifera*, do not meet fully the characteristics of identity and quality of honeys from stingless bee which indicate moisture levels ranging of 23.02 – 34.11 % (m/m), acidity of 36.45 -138.46 meq kg<sup>-1</sup>, pH of 3.73 – 5.31, diastase activity of <3 – 49.54 un. Göthe, , conductivity from 0.15 - 1.34 mS cm<sup>-1</sup>, sugars such as fructose from 31.11 – 40.20 % (m/m), glucose 8.20 - 30,98% (m/m), already for sucrose and 5-HMF contents were below the limits quantification (LOQ = 0.074 and 0.31 mg L<sup>-1</sup>, respectively. When we evaluate the total phenolic compounds (14.69 – 98.04 mg EAG 100 g) and antioxidant activity (DPPH-3.23 -18.57 mg EAA/100 g<sup>-1</sup>, FRAP- 64.00 – 666.66 µmol Fe II/100 g<sup>-1</sup>, ORAC- 199.16-624.48 µmol TE/100g<sup>-1</sup>) we can say that they are similar to those found for honeys from *Apis mellifera*. The validation parameters evaluated using electrophoretic showed appropriate analytical data for analysis of 5 - HMF and sugars in honeys from stingless bees. Regarding the results of the study of the thermal treatment of the stingless bee honeys showed levels of 5 - HMF high (238.18 mg kg<sup>-1</sup>), only when extreme temperatures were employed (75, 85 and 95 ° C). Moreover, the honey bee sting presents no levels of 5 - HMF three times under the same when subjected to extreme heat treatment of *Apis mellifera* honey. The results also suggest that a short heat treatment at high temperatures can be an effective way to increase the shelf life of honey from stingless bees without affecting the contents of 5 - HMF. Representative differences in the levels of 5 - HMF between the two types of honey indicate the need for specific honey from stingless bee parameters of

identity and quality in order to meet the particularities of honey and give subsidy to the legal marketing of honey distinctive quality.

**Keywords:** Stingless bees. Honey. Composition. Capillary electrophoresis. Thermal treatment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Abelha <i>Apis mellifera</i> com as descrições morfológicas básicas (a), estrutura de abelha sem o ferrão e com o saco de veneno (b) e sem ferrão e sem vesícula de veneno (c).....	24
Figura 1.2 -	Algumas abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.) encontradas no território brasileiro e sua terminologia popular.....	25
Figura 1.3 -	Mapa do Brasil com as principais espécies de abelha sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.) criadas em diferentes regiões do país, incluindo o Estado de Santa Catarina.....	26
Figura 1.4 -	Entrada para a colméia de diferentes espécies de abelha sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.).....	28
Figura 1.5 -	Estrutura física da colméia de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.) com favos de cria e potes contendo mel e pólen.....	29
Figura 1.6 -	Crescimento mundial na elaboração de documentos sobre o mel de abelhas sem ferrão entre 1952 -2012.....	44
Figura 1.7-	Países com maiores número de artigos e trabalhos sobre o mel de abelhas sem ferrão entre 1952 -2012.....	44
Figura 1.8-	Representação esquemática da instrumentação básica de eletroforese capilar.....	47
Figura 1.9-	Representação dos modos de detecção direta e indireta.....	48
Figura 2.1-	Mapa de Santa Catarina com a localização das amostras.....	59
Figura 3.1-	Curvas de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade para açúcares e 5-HMF.....	85
Figura 3.2-	Eletroferogramas obtidos para as leituras dos padrões de 5-HMF e açúcares (frutose, glicose, sacarose) das amostras de mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.).....	89



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1-	Parâmetros de identidade estabelecidos pela Legislação Brasileira, Legislação Mercosul e do <i>Codex Alimentarius</i> para o mel de <i>Apis mellifera</i> .....	33
Tabela 1.2-	Conteúdo de frutose, glicose e sacarose encontradas por outro autores em mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.).....	34
Tabela 1.3-	Características físico-químicas de méis de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.) apresentadas por outros autores.....	36
Tabela 2.1-	Identificação das espécies de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.) e descrição geográfica dos municípios de origem das amostras.....	58
Tabela 2.2-	Características físico-químicas determinadas nas amostras de mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.).....	64
Tabela 2.3-	Conteúdo de 5-HMF e atividade diastásica determinados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.).....	67
Tabela 2.4-	Conteúdos de frutose, glicose e sacarose % (m/m) encontrados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.).....	69
Tabela 2.5-	Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.).....	71
Tabela 3.1-	Os valores reais das variáveis independentes e seus níveis codificados do modelo experimental aplicado ao processo de tratamento térmico em amostras de mel de abelhas sem ferrão.....	83
Tabela 3.2-	Desempenho analítico dos métodos propostos por eletroforese capilar para o parâmetro de efeito de matriz e os limites de quantificação e determinação.....	86
Tabela 3.3-	Desempenho analítico dos métodos propostos por eletroforese capilar para o parâmetro de linearidade.	87
Tabela 3.4-	Desempenho analítico dos métodos propostos por eletroforese capilar para o parâmetro de precisão.....	88

Tabela 3.5- Modelo experimental após o tratamento térmico para mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.)... 90

Tabela 3.6- Açúcares redutores (frutose e glicose) e 5-HMF em amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) e *Apis mellifera*, antes e após o tratamento térmico extremo..... 91

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH - 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloro  
CZE - eletroforese capilar de zona (do inglês, *capillary zone electrophoresis*)  
CTBA - brometo de cetil-trimetil-amônio  
CV% - coeficiente de variação  
DAD - detector de arranjo de diodos (do inglês, *diode Array detector*)  
DI - diâmetro interno  
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
EAA - equivalentes a ácido ascórbico  
EAG - equivalentes a ácido gálico  
CE - eletroforese capilar (do inglês, *capillary electrophoresis*)  
EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
FRAP – Poder de Redução do Ferro (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Potential*)  
HCl - ácido clorídrico  
HMF - hidroximetilfurfural  
IR- índice de refração  
LOD -limite de detecção (do inglês, *limit of detection*)  
 $L_{ef}$  - comprimento efetivo  
LOQ - limite de quantificação (do inglês, *limit of quantification*)  
 $L_{tot}$  - comprimento total  
m/m - razão massa/massa  
m/v - razão massa/volume  
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
mbar - milibar  
MEKC - cromatografia eletrocinética micelar capilar (do inglês, *micellar electrokinetic chromatography*)  
mEq - miliequivalente (s)  
MeOH - metanol  
mS - milisiemens  
ORAC - Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (do inglês, *Oxygen radical absorbance capacity*)  
PI- padrão interno  
r - coeficiente de correlação de Pearson  
 $R^2$  - coeficiente de determinação  
SDS - dodecil-sulfato de sódio  
TBS - tetraborato de sódio

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina  
UV/Vis - ultravioleta/visível



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
<b>1 A MELIPONICULTURA .....</b>	<b>23</b>
1.1 Abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> spp.).....	23
<b>2 MEL: DEFINIÇÃO, IDENTIDADE</b>	
<b>QUALIDADE.....</b>	<b>31</b>
2.1 Definição.....	31
2.2 Parâmetros de identidade e qualidade dos méis.....	32
<b>3 TÉCNICAS PARA CONSERVAÇÃO DO MEL.....</b>	<b>39</b>
<b>4 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE</b>	
<b>ANTIOXIDANTE EM MÉIS.....</b>	<b>41</b>
<b>5 RELEVÂNCIA DO ESTUDO DO MEL DE ABELHA</b>	
<b>SEM FERRÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6 ELETROFORESE CAPILAR: TÉCNICA</b>	
<b>INSTRUMENTAL AVANÇADA APLICADA EM</b>	
<b>ANÁLISES DE MEL DE MEL .....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO 2 - MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO</b>	
<b>(<i>Meliponinae</i> spp.): IDENTIDADE E QUALIDADE,</b>	
<b>COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA</b>	
<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>51</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>53</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
2.1 Material.....	56
2.2 Amostras.....	57
2.3 Parâmetros de identidade e qualidade.....	59
2.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante em	
mel.....	61
2.5 Análise Estatística.....	63
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
3.1 Parâmetros de identidade e qualidade.....	63
3.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	70
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>

<b>CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL E DO CONTEÚDO DE AÇÚCARES UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR EM MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO, ANTES E APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO.....</b>	<b>75</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>77</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>80</b>
2. Reagentes e soluções .....	80
2.2 Preparo de amostra.....	81
2.3 Instrumentação.....	81
2.4 Delineamento experimental para a aplicação do tratamento térmico.....	82
2.5 Procedimento de validação parcial para o mel de abelhas sem ferrão.....	83
2.5.1 <i>Linearidade e efeito de matriz</i> .....	83
2.5.2 <i>Precisão e exatidão</i> .....	84
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
3.1 Avaliação de alguns parâmetros de validação de método utilizados para o mel de abelhas sem ferrão.....	84
3.1.1 <i>Linearidade e efeito matriz</i> .....	84
3.1.2 <i>Precisão e exatidão</i> .....	87
3.2 Efeitos do tratamento térmico sobre 5- HMF e açúcares do mel de abelhas sem ferrão.....	88
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

## INTRODUÇÃO

As abelhas têm sido manejadas pelos homens, desde séculos passados, para extração de mel, pólen, própolis, cera, entre outros produtos utilizados para consumo próprio. Nas últimas décadas, esta atividade tornou-se rentável em muitos lugares do mundo (ANACLETO et al., 2009; NOGUEIRA-NETO, 1997; QUEIROZ; BARBOSA; SOUSA et al., 2013). Duas grandes linhas de produção desses produtos são destaques no Brasil: a apicultura e a meliponicultura. A apicultura com a criação racional de *Apis mellifera* é amplamente difundida e estudada, com maior produção e comercialização de mel e outros produtos (VIEIRA, 2012). A meliponicultura, por sua vez, é uma atividade de criação de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) onde, os estudos e comercialização ainda são recentes em todo o mundo (SOUSA et al., 2013; VILLAS-BÔAS, 2012; WALDSCHMIDT; COSTA, 2007).

A meliponicultura é difundida em países tropicais e subtropicais, e ganha destaque pela criação racional de abelhas com ferrão atrofiado. Essa subfamília (*Meliponinae* spp.), pode ser dividida em três tribos: *Meliponini*, *Trigonini* e *Lestrimelittini*, possuem hábitos distintos das demais abelhas, como a coleta de néctar de plantas mais rasteiras, revoadas curtas para buscar alimento, colméias em sentido horizontal, sem a elaboração de favos para armazenamento do mel, formam os potes para reserva de alimento e sua criação é possível em locais próximos a residências, podendo ser manejadas por pessoas de várias idades (NOGUEIRA-NETO, 1997; OLIVEIRA; SANTOS, 2011; VILLAS-BÔAS, 2012). Além das diferenças na estrutura e manejo, os produtos elaborados pelas abelhas sem ferrão também são diferenciados quanto a sua composição (NOGUEIRA-NETO, 1997; XIMENES; COSTA; NACIMENTO, 2011).

Com características sensoriais próprias (cor, sabor, odor e textura), o mel de abelhas sem ferrão contém nutrientes básicos necessários para a saúde como: açúcares (frutose e glicose), água e uma grande quantidade de compostos minoritários como proteínas, enzimas, minerais, vitaminas, ácidos orgânicos, compostos voláteis, compostos fenólicos, carotenóides incluindo compostos com atividade antioxidante e antimicrobiana, características muito procuradas por indústrias farmacêuticas para uso no tratamento de doenças pulmonares e por indústrias alimentícias para enriquecer seus produtos (SILVA et al., 2013a,b; SOUZA et al., 2009a,b).

O mel dessas abelhas sempre esteve presente na cultura indígena e rural brasileira e ainda hoje é utilizado como alimento, apreciado em pratos salgados e doces, e empregado como medicamento popular para tratamento de diversas doenças (OLIVEIRA et al., 2012). Estudos relatam seu uso como antibacteriano, bacteriostático, antiinflamatório, cicatrizante de feridas e queimaduras, no tratamento de distúrbios intestinais, doenças pulmonares entre outras (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005; SOUZA et al., 2004a,b).

A qualidade do mel produzido pelas abelhas sem ferrão é fundamental para sua valorização no mercado interno, e como produto de exportação. Vários fatores podem afetar a composição e a qualidade do mel, entre eles a origem floral e geográfica, condições de manipulação, processamento, estocagem ou até mesmo fraudes (ANKLAM, 1998; GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002). Neste sentido, a avaliação da composição do mel se faz importante para comprovar seus benefícios à saúde e evidenciar sua autenticidade e sua qualidade, protegendo o consumidor de possíveis fraudes ou de produtos com qualidade inferior (FÉAS et al., 2010b).

Este trabalho é composto por três capítulos, organizados da seguinte forma: o Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica contextualizada sobre o mel de abelha sem ferrão (*Meliponinae* spp.), suas características de identidade e qualidade e propriedades antioxidantes, bem como uma breve revisão sobre a técnica de eletroforese capilar (EC). O Capítulo 2 trata da caracterização de amostras de mel de abelhas sem ferrão produzidas em três municípios do Estado de Santa Catarina na safra 2012/2013, quanto aos seus parâmetros de identidade e qualidade, presença de compostos bioativos e atividade antioxidante. O Capítulo 3 aborda a avaliação de alguns parâmetros de validação dos métodos analíticos para a determinação de açúcares e 5-hidroxi-metilfurfural, em amostras de mel de abelha sem ferrão, ambos empregando a técnica de eletroforese capilar, antes e após tratamento térmico.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1 A MELIPONICULTURA

### 1.1 Abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.)

A meliponicultura é caracterizada pela criação racional, controlada pelo ser humano, em colmeias artificiais, utilizando-se de métodos e equipamentos para melhor explorar a capacidade natural destes insetos, popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão, meliponídeos, abelhas nativas, indígenas ou do inglês, *stingless bees* (REIS; FILHO, 2003; SOUZA et al., 2009a; XIMENES; COSTA; NASCIMENTO, 2011).

Estima-se que no mundo existam 30.000 espécies de abelhas, cada uma apresentando diferentes comportamentos, níveis de sociabilidade, preferências alimentares, dentre outros aspectos. Sendo assim, para facilitar o estudo, é possível dividi-las em diversas famílias, subfamílias, tribos e subtribos (SOUZA et al., 2009a). A superfamília *Apoidea*, possui quatro subfamílias: *Apinae*, *Bombinae*, *Euglossinae*, *Meliponinae* e entre as fêmeas dessas subfamílias, somente as *Meliponinae* possuem o ferrão atrofiado, o qual não pode ser utilizado como meio de defesa. Essa subfamília pode ser dividida em três tribos, as *Meliponini*, as *Trigonini* e as *Lestrimelittini* (NOGUEIRA-NETO, 1997; WALDSCHMIDT; COSTA, 2007; VILLAS-BÔAS, 2012).

As *Meliponini* possuem um único gênero, as *Meliponas* com aproximadamente 20 espécies, e se caracterizam por não construírem células reais. Todas as rainhas, operárias e machos nascem e se desenvolvem dentro de células de cria, de tamanho igual. A determinação do número de rainhas que nasce entre todos os ovos disponíveis, é definida por uma proporção genética (GUERRINI et al., 2009; PERUQUETTI; SILVA; DRUMOND, 2012; VILLAS-BÔAS, 2012).

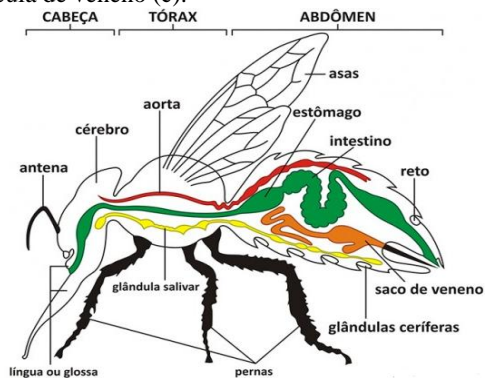
As *Trigonini* possuem dez gêneros e aproximadamente 120 espécies. Constroem células de dois tamanhos: as células das operárias e as células reais, com tamanho bem maior, onde as larvas recebem mais alimento, determinando a formação de uma nova rainha virgem (CARVALHO et al., 2005; VILLAS-BÔAS, 2012). Existe, ainda, a tribo *Lestrimelittini*, que compreende os meliponíneos, que vivem, exclusivamente, de roubos de alimento, constituindo um grupo bastante pequeno (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Antes da colonização das Américas pelos europeus, o uso dos produtos das abelhas sem ferrão e a sua criação faziam parte dos costumes sociocultural, alimentares, medicinais, ritualísticos e

comerciais de muitos povos indígenas, estes costumes foram passados aos padres jesuítas que chegaram ao Brasil e utilizavam a cera de abelha sem ferrão para a produção de velas e para os moradores que foram se alocando nas zonas rurais e aos poucos foram introduzindo esses produtos na sua cultura, principalmente no combate de doenças respiratórias, doenças oculares e uso para a cicatrização de lesão na pele. Esses povos utilizavam os produtos de abelha sem ferrão tanto por via oral quanto por aplicação tópica no combate de doenças (BORSATO, 2013).

As abelhas sem ferrão são abelhas sociais, ou seja, vivem em colônias com grandes números de abelhas. Possuem tamanho considerado pequeno (2 - 13 mm), em relação à abelha *Apis mellifera*, e coloração diferenciada, variando entre cores claras (amarelo) e escuras (marrom e preto). Dependendo de cada tribo ou gênero, possuem ferrão atrofiado ou ausência de ferrão, ou ainda, a ausência da vesícula de veneno (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Abelha *Apis mellifera* com as descrições morfológicas básicas (a), estrutura de abelha sem o ferrão e com o saco de veneno (b) e sem ferrão e sem vesícula de veneno (c).



(a) *Apis mellifera*



(b) Abelhas sem ferrão



(c) Abelhas sem ferrão

Fonte: Oliveira (2013).



Não são ofensivas, porém, para sua defesa, podem expelir líquidos ácidos ou básicos, irritando a pele de seus predadores, enrolar nos cabelos ou pêlos ou até mesmo entrar nas vias respiratórias (BORSATO, 2013; CARVALHO et al., 2005; WALDSCHMIDT; COSTA, 2007; SOUZA et al., 2009a,b; NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012). Na Figura 1.2, estão expostas algumas imagens das abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) encontradas no território brasileiro.

Figura 1.2 - Algumas abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) encontradas no território brasileiro e sua terminologia popular.



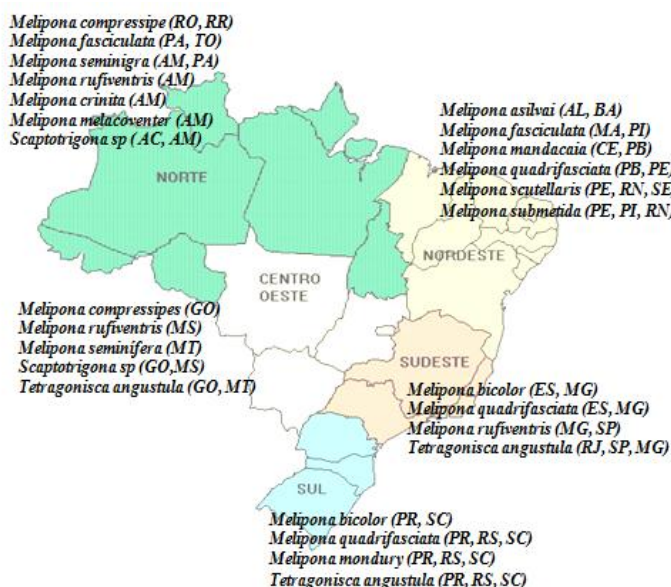
Fonte: adaptado de Manara (2013); Züge (2013).

As abelhas sem ferrão são nativas do território brasileiro e a sua utilização para qualquer fim está sujeita às exigências do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, através da Resolução n°. 346, de 16 de agosto de 2004, onde estão dispostos, adequadamente, os critérios para o manejo dessas abelhas (BRASIL, 2004). Além do Brasil, outros países tropicais e subtropicais das Américas Central, América do Sul, África, Índia, Malásia, Austrália, entre outros países da Oceania (GUERRINI et al., 2009; SOUZA et al., 2009a), também estão presentes as abelhas sem ferrão.

O Brasil apresenta grande número de espécies de *Meliponinae* spp. e é na região amazônica onde se encontra a maior diversidade, devido sua rica flora, sendo que as abelhas da tribo *Meliponini* apresentam-se em maior quantidade e, conseqüentemente, com maior produção de mel (BORSATO, 2013; SOUZA et al., 2009a). Estados, como São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, também já

apresentam crescimento na criação, e consequentemente uma boa produção de mel de abelha sem ferrão (WITTER; BLOCHTEIN, 2009). A Figura 1.3 ilustra as principais espécies produtoras criadas em diferentes regiões do Brasil.

Figura 1.3 - Mapa do Brasil com as principais espécies de abelha sem ferrão (*Meliponinae* spp.) criadas em diferentes regiões do país, incluindo o Estado de Santa Catarina.



Fonte: Adaptado de Villas-Bôas (2012).

As abelhas são insetos que se organizam socialmente, divididos em três castas: rainhas, zangões e operárias. Na classe das rainhas existem as rainhas virgens e as rainhas poedeiras. As rainhas virgens são poedeiras em potencial, e estão sempre disponíveis nas colônias para uma eventual substituição da rainha poedeira, em caso de morte ou enxameagem e podem chegar a representar 25% dos indivíduos de uma colônia (VILLAS-BÔAS, 2012; BORSATO, 2013). As rainhas poedeiras realizam a postura dos ovos, que dão origem a todos os tipos de abelhas. São também responsáveis pela organização da colônia, comandada por um complexo sistema de comunicação baseado no uso de feromônios. Normalmente uma colônia possui apenas uma rainha

poedeira, mas existem relatos da existência de colônias com duas ou mais (CARVALHO et al., 2005; NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012).

Os machos ou zangões são indivíduos reprodutores e vivem basicamente para acasalar com as rainhas virgens. Entretanto, diferentemente das abelhas *Apis mellifera*, podem realizar alguns pequenos trabalhos, como a desidratação de néctar e a manipulação da cera (VILLAS-BÔAS, 2012). As operárias, por sua vez, representam a maior parte das abelhas de uma colônia, podendo chegar a mais de 80% dos indivíduos. Cuidam da defesa e manipulam os materiais de construção dos ninhos, coletam e processam o alimento. As abelhas sem ferrão, ainda trabalham na estrutura dos ninhos formados, a partir de materiais retirados da natureza, como o barro, e substâncias produzidas ou processadas dentro da colônia como a própolis, cera, cerume e o geoprópolis (CARVALHO et al., 2005; NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012; WALDSCHMIDT; COSTA, 2007).

A arquitetura dos ninhos pode variar de acordo com a espécie, material disponível para construção e do local onde a *Meliponinae* instalam suas colônias, podendo nidificar (construir ninhos) em cavidades no solo, em cupinzeiros, formigueiros abandonados, troncos de árvores, postes, muros, caixas e nos mais diversos locais onde possam estar seguras para o desenvolvimento da colmeia. Característica marcante de cada espécie é a forma de entrada nos ninhos (Figura 1.4), podendo ser um simples orifício ou até grandes construções de caminhos (bocas) com arquiteturas específicas das espécies (FONSECA et al., 2006; NOGUEIRA-NETO, 1997; SOUZA; CARVALHO; ALVES; 2006; VILLAS-BÔAS, 2012; WALDSCHMIDT; COSTA, 2007).

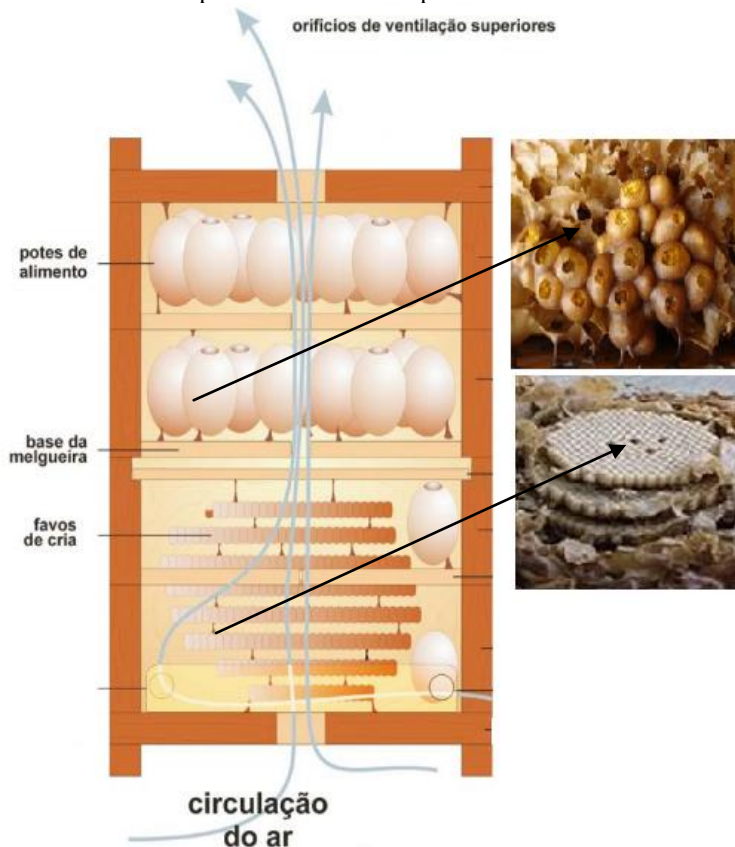
Figura 1.4 - Entrada para a colméia de diferentes espécies de abelha sem ferrão (*Meliponinae* spp.).



Fonte: Abreu (2012); Villas-Bôas (2012).

A colônia de abelhas sem ferrão é construída em discos e potes, dispostos na horizontal, envolvidos por uma grande quantidade de lamelas de cera que servem como isolamento térmico. Na Figura 1.5 é possível observar a estrutura da colônia de abelha sem ferrão, que possui dois elementos principais, os favos de cria e os potes de alimento. Os favos de cria são construídos em forma de discos e os potes de alimento, que formam as melgueiras, geralmente são construídos de cerume, em formato elipsóide (em formato de ovo) (FONSECA et al., 2006; SOUZA et al., 2009a VILLAS-BÔAS, 2012).

Figura 1.5 - Estrutura física da colmeia de abelha sem ferrão (*Meliponinae* spp.) com favos de cria e potes contendo mel e pólen.



Fonte: Venturieri (2007).

A retirada do mel das melgueiras deve ser realizada quando estas estiverem populosas, o que ocorre durante e ou logo após as floradas. Caso todo o mel da colônia seja coletado ao final da floração, o meliponicultor deve ficar atento para a necessidade de alimentação artificial das suas colônias durante o período de entressafra (VILLAS-BÔAS, 2012).

A quantidade de mel extraído dependerá da espécie produtora, pois a diversidade das abelhas sem ferrão, como tamanho do corpo e população da colônia, é refletida no volume de sua produção. Certas

espécies podem produzir quantidades consideráveis, variando de 0,5 a 8 litros de mel por colônia/por ano (BIJLSMA et al., 2006; VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007; SOUZA; CARVALHO; ALVES; 2006). A desoperculação dos potes para a retirada do mel pode ser realizada com objetos pontiagudos de inox higienizados, ou então com seringas, bombas de sucção ou compressão (FONSECA et al., 2006; WALDSCHMIDT; COSTA, 2007). Além disso, segundo os meliponicultores, os méis de abelhas sem ferrão possuem elevado valor comercial (70,00- 180,00 reais o kg) quando comparado aos méis de *Apis mellifera* (6,8 – 25,00 reais o kg), tornando-se importante e necessária a padronização e autenticação desses méis influenciando principalmente na renda da agricultura familiar.

Juntamente com as demais espécies, as abelhas sem ferrão desempenham um papel fundamental como agentes polinizadores, pela sua abundância na natureza, ampla distribuição geográfica e atração pelas flores (SOUZA et al., 2009a), produzindo derivados como cera, própolis, cerume, geoprópolis, geléia real, pólen, mel.

Cera - produzida na própria colônia, é uma substância secretada por abelhas operárias jovens, através de glândulas existentes no abdômen e pode ser utilizada para a produção de favo de cria (NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012).

Própolis - substância resinosa formada pela composição de cera, pólen e compostos retirados pelas abelhas da superfície das pétalas de flores, folhas, cortes de troncos e pelas suas enzimas salivares. É utilizada pelas abelhas para impermeabilizar e isolar termicamente a entrada das colméias (SOUZA et al., 2009a; VILLAS-BÔAS, 2012).

Cerume - constituído pela mistura de duas substâncias, cera pura, secretada pelas abelhas operárias, e resina (própolis). O cerume é utilizado na construção dos favos de crias e potes de armazenamento do mel (XIMENES; COSTA; NASCIMENTO, 2011).

Geoprópolis – formada por diversos materiais, tais como resinas, cera e barro, é utilizada para a construção e proteção dos ninhos contra inimigos. A mistura desse material tem consistência dura e coloração característica do barro da região (VILLAS-BÔAS, 2012).

Geléia real – substância viscosa, secretada pelo sistema glandular cefálico das abelhas operárias, que se alimentam com o pólen, e serve de alimento para as crias na fase inicial e para a rainha. Contém hormônios, vitaminas, aminoácidos, enzimas, lipídeos e outras substâncias que agem sobre o processo de regeneração celular. A geléia real é muito utilizada na indústria farmacêutica (COSTA; OLIVEIRA, 2005; XIMENES; COSTA; NASCIMENTO, 2011).

Pólen - é o conjunto de grãos minúsculos, produzidos pelas flores das angiospermas ou pelas pinhas masculinas das gimnospermas, e que constituem os elementos reprodutores masculinos, que fecundam os óvulos e originam as sementes (XIMENES; COSTA; NASCIMENTO, 2011).

Pólen apícola - é o resultado da aglutinação do pólen e do néctar das flores, juntamente com substâncias salivares das abelhas, efetuado pelas abelhas operárias, o qual é recolhido na entrada da colmeia (*Apis Mellifera*) (BRASIL, 2001). O pólen das abelhas sem ferrão é depositado em potes exclusivos, o que torna muito fácil sua exploração. Nestes potes, o pólen natural coletado nas flores, é processado pelas abelhas, as quais depositam nele enzimas, que auxiliam na sua conservação natural. Por ser diferente do pólen in natura, o produto das abelhas nativas recebe nomes especiais: saburá ou samburá, dependendo da região do Brasil. Rico em proteína, o pólen tem sido cada vez mais procurado no mercado de alimentos naturais. Para ser vendido, geralmente é processado de duas maneiras: desidratado ou misturado com mel (VILLAS-BÔAS, 2012).

Mel - o mel é produzido a partir do néctar de flores, que as abelhas coletam e armazenam, após ser submetido a processo físico (desidratação) e químico (enzimático) pelos próprios insetos, os quais transformam o néctar verde em néctar maduro. Serve como alimento para as abelhas na estação de inverno e é o produto das abelhas mais consumido pelos humanos (COSTA; OLIVEIRA, 2005; XIMENES; COSTA; NASCIMENTO, 2011).

## **2 MEL: DEFINIÇÃO, IDENTIDADE E QUALIDADE**

### **2.1 Definição**

De acordo com o que a legislação brasileira estabelece para méis de abelhas *Apis mellifera*, entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

O mel pode ser classificado quanto a sua origem, em mel floral ou mel de melato. O mel floral é obtido dos néctares das flores, enquanto que o mel de melato é obtido principalmente a partir de

secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (BRASIL, 2000).

O mel floral ainda pode ser classificado em unifloral ou monofloral, quando o néctar coletado origina-se de flores de uma mesma família, gênero ou espécie, ou multifloral e polifloral, quando o néctar coletado é decorrente de diferentes origens florais (BRASIL, 2000; LÉON-RUIZ et al., 2011; VIEIRA, 2012). De modo geral, méis monoflorais são mais raros, mais difíceis de produzir e apresentam aromas característicos, indicando a origem do néctar e, conseqüentemente, são mais valorizados comercialmente (LÉON-RUIZ et al., 2011; VANHANEN; EMMERTZ; SAVAGE, 2011).

## 2.2 Parâmetros de identidade e qualidade dos méis

Do ponto de vista químico, o mel é composto majoritariamente de açúcares, principalmente frutose e glicose, e contém, em menores quantidades mais de 200 outras substâncias, como proteínas, enzimas, minerais, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, vitaminas, ácidos fenólicos, flavonóides, carotenóides, produtos da reação de Maillard, cera, e grãos de pólen (BERETTA et al., 2005; BLASA et al., 2006; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). Sua composição e qualidade dependem de fatores como origem floral e geográfica, condições climáticas, processamento, armazenamento e espécie produtora (BERETTA et al., 2005; BERTONCELJ et al., 2007; FERREIRA et al., 2009; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010; TURHAN et al., 2008).

Trabalhar com um produto capaz de variar em diversos aspectos, e que contenha uma ampla composição química, traz a necessidade da existência e/ou elaboração de normas para padronização dos parâmetros de identidade e qualidade, para que seja tratado como produto comercial com uma legislação prevista para sua comercialização.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pelo regulamento técnico de identidade e qualidade de méis, fiscalizando os parâmetros físico-químicos relacionados à maturidade, pureza e deterioração das amostras através da Instrução Normativa nº11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000). Tal regulamentação não especifica as diferentes espécies de abelha das quais provem o mel, no entanto, sabe-se que tal instrução foi baseada em normatizações internacionais (*Codex alimentarius* e Mercosul) específicas para o mel de *Apis mellifera* (Tabela 1.1). Esses parâmetros não são totalmente adequados aos méis



de abelha sem ferrão, o que limita e impede sua produção e impossibilita sua comercialização (ANACLETO et al., 2009; CAMPOS; GOIS CARNEIRO, 2010; CODEX STAN 12, 2001; MERCOSUL, 1999; SOUSA et al., 2013).

Tabela 1.1- Parâmetros de identidade estabelecidos pela Legislação Brasileira, Legislação Mercosul e do *Codex Alimentarius* para o mel de *Apis mellifera*.

Parâmetros	Brasil (2000)	Mercosul (1999)	<i>Codex Alimentarius</i> (1999)
Umidade (% m/m)	Máx. 20,00	Máx. 20,00	Máx. 20,00
HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Máx. 60,00	Máx. 60,00	Máx. 80,00 em regiões tropicais
Atividade diastásica (Göthe)	Mín. 8,00*	Mín. 8,00	Mín. 8,00
Açúcares redutores (% m/m)	Mín. 65,00	Mín. 65,00	Mín. 60,00
Sacarose (% m/m)	Máx. 6,00	Máx. 6,00	Máx. 5,00
Cinzas (% m/m)	Máx. 0,60	Máx 0,60	-
Condutividade elétrica (μS cm <sup>-1</sup> )	-	-	Máx. 800,00
Acidez (meq kg <sup>-1</sup> )	Máx. 50,00	Máximo 50,00	Máx. 50,00
Cor	Quase incolor a pardo-escuro	Quase incolor a pardo-escuro	Incolor a pardo-escuro

\*Tolera-se 3,00 se o HMF for menor que 15,00 meq kg<sup>-1</sup>.

Fonte: Carvalho et al. (2005); Brasil (2000).

(-): Não analisado

Os açúcares existentes no mel são determinados em relação aos parâmetros de maturidade e qualidade considerando seus principais constituintes, glicose, frutose e sacarose, os quais lhe conferem viscosidade, sabor e aroma. O mel é considerado maduro quando atinge quantidades mínimas de açúcares redutores (65 % m/m) de acordo com a legislação (BRASIL, 2000; CARVALHO et al., 2005). Os méis de

abelhas sem ferrão podem apresentar uma grande variação no conteúdo de açúcares redutores (frutose + glicose), com valores inferiores aos exigidos pela legislação brasileira que contempla os méis de *Apis mellifera* (OLIVEIRA; SANTOS 2011). Na Tabela 1.2, é possível observar valores citados em alguns estudos onde, os teores de açúcares redutores para o mel de abelhas sem ferrão, variaram entre 42,2 a 93,10% (m/m).

Tabela 1.2 – Conteúdo de frutose, glicose e sacarose encontradas por outros autores em mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.).

Referência*	Açúcares (Frutose + Glicose) (% m/m)	Sacarose (% m/m)
1	66,00 - 76,20	1,13 - 8,35
2	64,29 - 82,10	0,61 - 6,19
3	57,97 - 48,66	-
4	50,6 - 93,10	0,2 - 9,00
5	44,90	-
6	54,85 - 66,49	4,4 - 8,89
7	58,14 - 61,4	3,24 - 5,54
8	50,01 - 65,79	0,89 - 6,08
9	42,2 - 64,00	1,50 - 10,20
10	50,50 - 72,77	-

\*Referencias: 1- Souza et al. (2004b); 2- Alves et al. (2005); 3- Anacleto et al. (2009); 4- Souza et al. (2009a); 5- Guerini al., (2009); 6-Campos; Góis; Carneiro, (2010); 7- Oliveira; Santos, (2011); 8- Holanda; Oliveira; Costa, (2012); 9- Sousa et al. (2013c); 10 - Silva et al. (2013a);

(-): Não analisado.

Os demais açúcares presentes no mel são representados por dissacarídeos, como a sacarose, com parâmetro estabelecido na legislação de, no máximo de 6% (m/m) (mel floral) e de 15% (m/m) (mel melato) (BRASIL, 2000). Para méis de abelhas sem ferrão (Tabela 1.2), esses valores podem variar, dependendo da espécie e da florada de origem, como apontam os estudos realizados por de Souza et al. (2009b) e Sousa et al. (2013) apresentando valores de sacarose de 0,20% (m/m) e 10,20% (m/m), respectivamente.

A água é o segundo maior componente do mel, sendo o teor de umidade uma das características mais importantes, capaz de influenciar diretamente nas características: como maturidade, viscosidade, peso específico, cristalização, vida de prateleira, características sensoriais e valor comercial (BIJLSMA et al., 2006; GUERRINI et al., 2009). A

água presente nos méis pode estar relacionada com a origem floral, origem geográfica, condições climáticas e estação do ano em que é realizada a colheita (BIJLSMA et al., 2006). O conteúdo de umidade é considerado um parâmetro de qualidade, relacionado à maturidade, que segundo a legislação brasileira para mel de *Apis mellifera* (Tabela 1.1), não deve exceder a 20% (m/m) (BRASIL, 2000).

Entretanto, todos os méis de abelhas sem ferrão considerados maduros, aptos para a colheita, com adequada manipulação, apresentam valores de umidade, acima dos estabelecidos pela legislação brasileira para mel de *Apis mellifera*, como relatado nos estudos de Fonseca et al. (2006) e Souza et al. (2009b) que apontam valores de 16,72 a 43,80% (m/m), respectivamente (Tabela 1.3). Esses teores de umidade elevados podem influenciar na fermentação indesejável dos açúcares por leveduras, que fazem parte da microbiota própria do néctar ou veiculados durante o manejo, resultando em compostos orgânicos indesejáveis que conferem gosto amargo, coloração indesejada e uma consequente redução da vida de prateleira do produto (ABREU et al., 2005; ABRAMOVIČ et al., 2008; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010).

Tabela 1.3 – Características físico-químicas de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) apresentadas por outros autores.

Ref*	Umidade (% m/m)	Acidez livre (mEq kg <sup>-1</sup> )	Condutividade elétrica (mS cm <sup>-1</sup> )	pH	HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Diastase (Gothe)
1	26,80 - 32,00	21,50 - 80,50	0, 287 - 0, 525	3,27 - 4,38	0,52 - 7,93	-
2	23,14 - 32,50	18,50 - 62,50	0, 267 - 0, 462	3,16 - 3,54	0,52 - 16,54	-
3	16,72 - 38,94	8,88 - 168,00	0, 180- 1, 070	3,15 - 4,66	0,33 -30,50	0,67 – 35,60
4	17,02- 35,40	27,4 - 86,20	-	-	-	-
5	21,00 - 43,80	5,1 - 116,80	0, 255- 0, 906	3,12- 6,50	0,0- 42,80	3,80- 11,00
6	23,00 - 32,50	17,00- 98,00	1,061- 2, 700	3,54 - 4,64	0,75 - 30,58	7,16 - 54,11
7	24,50 - 25,00	37,78 - 39,35	-	3,49 -4,53	4,20- 5,80	-
8	22, 05 - 22,72	37,00 - 85,50	0, 540 - 0,571	3,71 - 4,46	-	-
9	21,45 - 27,51	24,65 - 42,67	-	3,1 - 4,4	8,92 – 70,79	0, 60 – 2,1
10	22,30 - 23,40	24,66 - 59,66	-	2,90 - 3,83	-	-

\*Referência: 1- Souza et al. (2004a); 2- Alves et al. (2005); 3 - Fonseca et al. (2006); 4- Sousa et al. (2013); 5-Souza et al. (2009a); 6 - Anacleto et al. (2009); 7- Oliveira; Santos (2011); 8- Campos; Góis; Carneiro (2010); 9- Holanda; Oliveira; Costa (2012); 10 - Silva et al. (2013).

(-): Não analisado.

A acidez livre é considerada um indicativo de deterioração do mel e pode ser influenciada, pelas enzimas das glândulas mandibulares das abelhas, quantidade de minerais presentes no mel e as diferentes fontes de néctar. Altos valores de acidez livre são indicadores da ocorrência de fermentação dos açúcares, pela ação de leveduras, sendo assim o nível máximo de acidez permitido pela legislação vigente é de  $50 \text{ mEq kg}^{-1}$  para méis de abelha *Apis mellifera* (CAMPOS; GOIS; CARNEIRO; BRASIL, 2000; OLIVEIRA; SANTOS, 2011). Considerado um produto naturalmente ácido, devido à presença de ácidos glucônico, pirúvico, málico e cítrico, entre outros, composto basicamente de açúcares e com baixa atividade de água, o mel pode ter uma conservação prolongada (ANKLAM, 1998; AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2009). Entretanto, para méis de abelhas sem ferrão a acidez é extremamente variável (Tabela 1.3), podendo apresentar valores de 5,1 a  $168 \text{ mEq kg}^{-1}$  (FONSECA et al., 2006; SOUZA et al., 2009a,b).

O pH do mel geralmente apresenta valores baixos, em torno de 4,0, o que inibe a presença e o crescimento de micro-organismos, além de ser importante durante a extração e estocagem, por influenciar na estabilidade e vida de prateleira do produto (OUCHEMOUKH; LOUAILECHE; SCHWEITZER, 2007; BERTONCELJ et al., 2011a). Evangelista-Rodrigues e colaboradores (2005), em seus estudos, observaram a ocorrência de diferentes pHs entre os méis de abelhas *Apis mellifera* e *Meliponinae spp.* mesmo quando produzidos na mesma localidade, fator que pode ser explicado pelas diferenças de pH do néctar coletado das flores e as diferentes substâncias mandibulares acrescentadas ao néctar no decorrer da produção do mel.

Sabe-se que o mel, no seu processo de formação, contém enzimas provenientes das plantas e das glândulas hipofaríngeas dos insetos, onde as principais, presentes no produto, são invertase, glicose-oxidase e as diastases ( $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases) (ALVES et al., 2005; PIRES, 2011).

A invertase é responsável pela conversão da sacarose (dissacarídeo), em dois monossacarídeos, glicose e frutose. Sua ação é contínua até que o amadurecimento total do mel ocorra. Assim, pode-se definir o amadurecimento do mel como a inversão da sacarose do néctar pela enzima invertase e sua simultânea mudança de concentração (BAYRAMOĞLU et al., 2009; FENNEMA, 2010).

A glicose-oxidase reage com a glicose e forma o ácido glucônico, que é um importante componente do mel. Nesse processo o peróxido de hidrogênio é um subproduto, ele é responsável pela ação

antibacteriana do mel, que é uma de suas importantes propriedades (FRANCHIN et al., 2008; SAKAČ; SAK-BOSNAR, 2012).

As diástases (a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase) são as enzimas que hidrolisam o amido, onde, sua função na fisiologia da abelha, ainda não é claramente compreendida. A  $\alpha$ -amilase digere parcialmente o amido produzindo as dextrinas. Já a  $\beta$ -amilase cliva amilose e amilopctiva, produzindo a maltose (SAKAČ; SAK-BOSNAR, 2012; TOSI, 2008). As diastases apresentam alto grau de instabilidade frente às temperaturas elevadas e sua presença, ou não, se faz importante na tentativa de detectar possíveis aquecimentos do mel comercialmente vendido, apesar de que também em temperaturas ambientes ela pode vir a deteriorarem-se quando o armazenamento for prolongado (CRANE, 1975; HUIDOBRO et al., 1995; SAKAČ; SAK-BOSNAR, 2012). Sendo assim, a legislação preconiza que os méis de abelha *Apis mellifera* devam apresentar atividade diastásica acima de 8 unidades na escala Göthe. Porém, méis com baixo conteúdo enzimático natural, podem apresentar no mínimo 3 unidades Göthe, desde que o conteúdo de HMF não exceda a 15 mg kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000).

O 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) é muito utilizado como parâmetro de qualidade no mel, por ser um composto químico formado pela reação de açúcares em meio ácido juntamente com temperaturas elevadas. Em países tropicais como o Brasil, com temperaturas elevadas em determinadas épocas do ano, o processamento e o armazenamento inadequado do mel durante longos períodos, podem levar à conversão de açúcares em HMF, através da desidratação de hexoses em meio ácido, via reação de Maillard ou por adição fraudulenta de açúcares invertidos (ARAÚJO; SILVA; SOUZA, 2006; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010; VENTURIERI, 2007; KÜÇÜK et al., 2007). Para controlar as fraudes e garantir a qualidade do mel, a legislação estabelece um limite máximo de HMF para o mel de *Apis mellifera* de 60 mg kg<sup>-1</sup>. Para méis de abelhas sem ferrão os valores encontrados demonstram semelhança (Tabela 1.3) aos encontrados para abelha *Apis mellifera*, no entanto, não existem limites regulamentados.

A condutividade elétrica é basicamente utilizada na autenticidade dos méis, sendo possível distinguir méis florais e de melato. O valor de condutividade elétrica depende do teor de cinzas e da acidez do mel: quanto maior for o seu conteúdo, maior será a condutividade resultante (BOGDANOV; MARTIN; LULLMANN, 2002). A medida da condutividade elétrica não é uma exigência da legislação brasileira, porém o *Codex Alimentarius* preconiza que o mel floral apresente condutividade elétrica menor do que 0,8 mS.cm<sup>-1</sup> e mel

de melato apresente valores superiores a  $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$  (CODEX STAN 12, 2001). Para mel de abelhas sem ferrão esses valores podem variar de  $0,188$  a  $2,700 \text{ mS.cm}^{-1}$ , segundo estudos de Fonseca et al. (2006) e Anacleto et al. (2009), expostos na Tabela 1.3.

Sabe-se que o mel de abelhas sem ferrão é comumente associado às características do mel das abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), exigindo-se os mesmos parâmetros de identidade e qualidade. Entretanto, méis de abelhas sem ferrão possuem características peculiares como sabores e aromas diferenciados, textura mais fluida, que cristaliza lentamente (ALVES et al., 2005).

### 3 TÉCNICAS PARA CONSERVAÇÃO DO MEL

O mel de abelhas sem ferrão tem como principal característica, a diferenciação da sua composição, destacando o teor de umidade e o percentual de açúcares, que o tornam menos denso e mais suscetível à fermentação, do que o mel das abelhas *Apis mellifera*, exigindo maiores cuidados quanto a sua conservação (ALVES et al., 2012; OLIVEIRA; SANTOS, 2011; TOSI; CIAPPINI; LUCERO, 2001). Dessa forma, os meliponicultores procuram alternativas para prolongar a vida de prateleira dos méis de abelhas sem ferrão, na busca de um beneficiamento que possa ser realmente eficaz, sem alterar as propriedades originais do produto (ALVES et al., 2012).

O beneficiamento é o processo de transformar um produto primário visando melhorar ou aprimorar o armazenamento, dando garantia de qualidade, conservação e apresentação comercial, podendo agregar valor comercial ao produto. No caso do mel de abelhas sem ferrão, os métodos de beneficiamento são utilizados para transformar o mel *in natura*, que possui grande potencial de fermentação, em um produto estável, mantendo suas características físicas, químicas e sensoriais o maior tempo possível (ALVES et al., 2012; VILLAS-BÔAS, 2012).

O beneficiamento não pode ser considerado pré-requisito para o consumo do mel, mas a aplicação de métodos de beneficiamento visa tanto, viabilizar a estocagem do mel para consumo pessoal, familiar ou comunitário, quanto à inserção dos méis de abelhas sem ferrão no mercado. Os métodos de beneficiamento utilizados para a conservação do mel são, principalmente, refrigeração, pasteurização e desidratação (VILLAS-BÔAS, 2012).

Na indústria de alimentos, a refrigeração é um método consagrado para retardar o processo de degradação dos produtos. Isso

acontece porque as baixas temperaturas dificultam o desenvolvimento dos micro-organismos. No caso do mel de abelhas sem ferrão, a refrigeração é um método muito eficiente, já que diminui a proliferação de leveduras e bactérias e retarda a fermentação (VILLAS-BÔAS, 2012). Em escala comercial, o uso da refrigeração pode se tornar complexo. Para adotar este método, o produtor deve refrigerar o mel logo depois da colheita, transportá-lo refrigerado e comercializá-lo sob refrigeração. Sua aplicação pode ser viável, mas depende da escala de produção e da elaboração de um plano de negócio minucioso que garanta lucro nas vendas (VILLAS-BÔAS, 2012).

A desidratação se refere ao processo de retirar ou diminuição da quantidade de água de determinado produto. Como alternativa para proporcionar maior duração, ou seja, impedir a fermentação acelerada recomenda-se que o teor de água do mel seja reduzido ao máximo de 20% (ALVES et al., 2012).

A pasteurização é um dos procedimentos mais utilizados em alimentos, para destruir micro-organismos patogênicos não esporulados e minimizar a carga microbiológica banal existente, oferecendo ao consumidor um alimento seguro e com vida útil prolongada. O processo de pasteurização é um tratamento térmico brando (temperaturas < 100 °C), que consiste basicamente no aquecimento e arrefecimento rápido do alimento, levando sempre em consideração o tempo e a temperatura (FELLOWS, 2006; ORAL et al., 2014; ORDÓÑEZ et al., 2005; VILLAS-BÔAS, 2012).

O tratamento térmico do mel é um método prático, que além de inibir o crescimento de micro-organismos, também é utilizado para retardar a cristalização e facilita o envase por redução da viscosidade. Entretanto, em relação às características do mel, o tratamento térmico ou pasteurização podem alterar suas propriedades físicas e químicas, como a formação de 5-HMF, principalmente por não ter método oficial para essa prática. Por esse motivo o mel deve ser monitorado quanto as suas características, para atestar a qualidade do produto, levando em consideração que o teor de 5-HMF é um parâmetro nacional e internacional, utilizado como controle de temperaturas elevadas, é o parâmetro o qual deve ser monitorado de modo a limitar a aplicação de um tratamento térmico (TOSI et al., 2002; TURHAN et al., 2008).



## **4 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MÉIS**

O metabolismo secundário dos vegetais é aquele que responde às condições ambientais (clima e solo) as quais está submetida a planta e a partir desse metabolismo são produzidos os compostos fitoquímicos (ANGELO; JORGE, 2007). A função destes metabólitos é a proteção das plantas contra estresses biológicos e ambientais. Muitos desses compostos apresentam atividade antioxidante e atuam como inibidores de radicais livres (BERTONCELJ et al., 2011b; KÜÇÜK et al., 2007).

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) são as moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados ou livres. Essa configuração faz dos radicais livres, moléculas altamente instáveis, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora (FERREIRA; ABREU, 2007; HALLIWELL, 2011; RIBEIRO et al., 2005). A presença de radicais, em excesso no organismo pode originar lesões em componentes celulares, podendo levar à oxidação dos lipídeos, proteínas, açúcares e ácidos desoxirribonuclêico (ADN) e ribonuclêico (ARN), assim, contribuindo para o desenvolvimento de inúmeras doenças, como Parkinson, Alzheimer e câncer, entre outras (ABREU, 2007; BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997; FERREIRA; DUDONNÉ et al., 2009; HALLIWELL, 2011; PEREIRA et al., 2009).

A produção inevitável de radicais livres pelo organismo pode ser minimizada com compostos antioxidantes, que tem a capacidade de reduzir eficazmente os radicais livres que induzem danos oxidativos em diferentes alvos biológicos, inibindo ou retardando a oxidação (APAK et al., 2007; BORA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008).

Os compostos antioxidantes podem estar presentes no organismo humano por mecanismos endógenos e pela dieta alimentar equilibrada (BAGHIANI et al., 2011; KOHEN; NYSKA, 2002). A maioria dos alimentos vegetais ingeridos diariamente em uma dieta equilibrada possui na sua constituição diversas moléculas com capacidade antioxidante. Dessa forma, tais moléculas produzidas pelas plantas, podem ser consumidas pelo homem através de alimentos para combater seu excesso de radicais livres, entre outros benefícios (MAGALHÃES et al., 2008).

Considerando que as plantas polinizadas pelas abelhas produzem néctar e esses são utilizados para produção de mel, sabe-se que é possível que os compostos bioativos sintetizados pelas plantas e

assim presentes no néctar, podem ser transferidos ao mel (KÜÇÜK et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2011b). O perfil e a quantidade destes compostos no mel são dependentes de fatores como espécie da planta fornecedora do néctar, condições climáticas e geográficas. Dessa forma, espera-se que méis oriundos de diferentes localidades apresentem atividade antioxidante diferentes (SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010).

Dentre as diversas classes de substâncias bioativas de ocorrência natural no mel, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por prevenir diversas doenças. No mel, além da importante função à saúde humana, o conteúdo de fenólicos totais também se destaca como uma importante ferramenta na determinação da origem floral do mel (ANDRADE et al., 1997; BALTRUŠAITYTĖ; VENSKUTONIS; ČEKŠTERYTĖ, 2007; BERTONCELJ et al., 2011b; IURLINA et al., 2007).

Atualmente, para avaliar ou quantificar a atividade antioxidante de mel são utilizados diferentes métodos *in vitro* ou *in vivo* (BERTONCELJ et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2011a; ESCUREDO et al., 2013; FERREIRA et al., 2009; KÜÇÜK et al., 2007; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010; SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010; KHALIL et al., 2011; JUNE; BESTER, 2012; SILVA et al., 2013a). As metodologias utilizadas para a determinação de capacidade antioxidante do mel não são oficiais e podem estar sujeitas a interferências, por isso, torna-se aconselhável a utilização de duas ou mais técnicas para a avaliação, visto que nenhum ensaio isolado determina a capacidade antioxidante exata ou capacidade antioxidante total de uma amostra (FERNANDES et al., 2004; HUANG et al., 2002 ; HUANG; OU; PRIOR, 2005). De acordo com a literatura, há uma grande utilização dos métodos, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*) para avaliação de compostos antioxidantes (KAMEYA et al., 2014).

O método do radical DPPH é um dos métodos mais utilizados para identificar o potencial antioxidante em diversas matrizes alimentares (BERETTA et al., 2005). O método de sequestro de radicais livres (DPPH) está baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, ou seja, a presença de elétrons desemparelhados do DPPH é responsável pela absorção máxima no comprimento de onda de 515 nm, resultando na cor púrpura, que sofre uma alteração de cor para amarelo, isso ocorre quando o elétron desemparelhado forma um par com o hidrogênio doado pelo composto antioxidante, convertendo o DPPH para sua forma reduzida (BERTONCELJ et al., 2007; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010).

O método de poder redutor de ferro (FRAP), é uma metodologia rápida e barata, também se baseia na transferência de elétrons. Este método testa a força antioxidante dos alimentos, via avaliação da redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$  (2,4,6-Tripiridil-s-triazina-TPTZ) a  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso-tripiri-diltriazina) por redutores em valor de pH baixo. O aumento da absorvância a 593 nm, devido à formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ , pode ser monitorado em espectrofotômetro (BERETTA et al., 2005; BERKER et al., 2007 ).

Outro método descrito na literatura para a determinação de antioxidantes é o ensaio de capacidade de absorção de oxigênio radical ou ORAC. O método ORAC verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante frente à formação de um radical peroxila induzido pelo 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), um iniciador de radical livre solúvel em água que se decompõe espontaneamente a 37 °C (BISBY; BROOKE; NAVARATNAM et al., 2008; SÁENZ et al., 2009; ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009; RUTKOWSKI et al., 2011; CASETTARI et al., 2012).

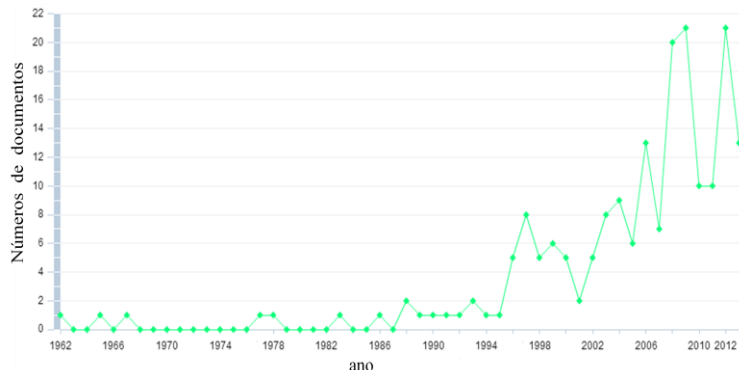
O radical peroxila, gerado pela reação do AAPH com oxigênio atmosférico, reage com indicador fluorescente (fluoresceína) para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência em 575 nm e 578 nm. Os antioxidantes são capazes de proteger a molécula fluorescente da degradação oxidativa, assim, o efeito protetor de um antioxidante é verificado calculando a área formada abaixo da curva em função do tempo (BISBY; BROOKE; NAVARATNAM, 2008; CAO; ALESSIO; CUTLER 1993; HUANG; OU; PRIOR, 2005; OU et al., 2001).

A quantificação fotométrica de compostos fenólicos totais, objetivada em muitos alimentos, é comumente realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu. O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfotungstíco ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), e pode gerar o óxido de tungstênio ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) e óxido de molibdênio ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) em meio alcalino na presença de compostos fenólicos, formando um complexo chamado de azul de molibdênio e azul tungstênio, cuja coloração permite a quantificação da absorvância da solução na região do visível (760 nm) (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007; CICCIO et al., 2009; RAMIREZ-SANCHEZ et al., 2010).

## 5 RELEVÂNCIA DO ESTUDO DO MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO

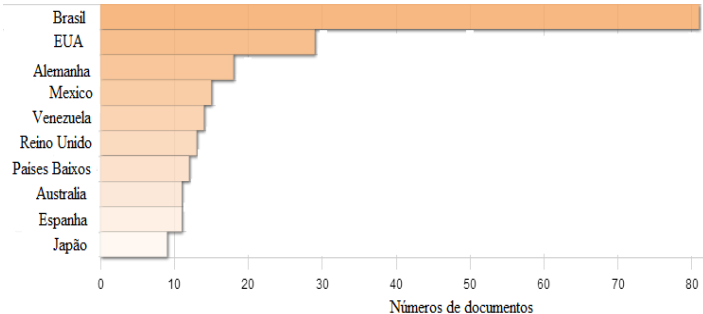
É necessário ressaltar que, para o desenvolvimento da bibliografia referente à *Meliponinae* spp. (abelhas sem ferrão) e sua caracterização, foram utilizados como base, livros, artigos científicos, cartilhas, entre outros meios de referências nacionais, pois trabalhos ou artigos publicados em revistas internacionais, ainda são limitados. Nas Figuras 1.6 e 1.7 é possível observar o desempenho e o crescimento nacional e internacional de estudos com espécie de abelhas sem ferrão no decorrer dos anos e os países com maiores desempenho na elaboração de artigos e trabalhos sobre abelhas sem ferrão.

Figura 1.6- Crescimento mundial na elaboração de documentos sobre o mel de abelhas sem ferrão entre 1952 -2012.



Fonte: SCOPUS (2013).

Figura 1.7- Países com maiores número de artigos e trabalhos sobre o mel de abelhas sem ferrão entre 1952 -2012.



Fonte: SCOPUS (2013).

Observa-se que o Brasil é o país com maior desempenho no desenvolvimento de pesquisas e publicações relacionadas às abelhas sem ferrão e que os estudos sobre esta espécie ainda são muito recentes. Enfatizando a necessidade de mais pesquisas e mais investimentos em torno de toda a cadeia produtiva referente às abelhas sem ferrão, como por exemplo, estudos com a morfologia das abelhas, suas preferências de *habitat* e de floradas e principalmente com os produtos provenientes dessas abelhas (mel, geléia real, própolis, entre outros), quanto às suas propriedades e/ou identidade e qualidade, benefícios a saúde humana, estudos estatísticos de comercialização e consumo nacional e internacional, manipulação ideal na colheita e pós-colheita dos produtos.

É importante salientar, que não foram encontrados números da produção e consumo deste mel, considerando a forma artesanal de comercialização em feiras livres ou diretamente com os meliponicultores em propriedades rurais e até mesmo sem rotulagem ou sem adequação comercial, pois a legislação existente (*Apis mellifera*) não é totalmente adequada aos atributos de mel de abelhas sem ferrão, dificultando assim o registro nos órgãos reguladores, a comercialização e, conseqüentemente, os estudos estatísticos para consumo e produção.

Além disso, realizou-se busca em bancos de dados como: Web of science, Scopus e na literatura especializada e foi possível observar que, até agora, nenhum estudo relata a relação entre tratamento térmico, quantificação do 5-HMF e açúcares em amostras de méis de abelhas sem ferrão. Também foi possível observar que estudos de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em méis de abelhas sem ferrão, ainda são escassos, sendo assim, se faz necessário mais pesquisas, análises e uma maior exploração de conhecimento desse produto para comprovar seus benefícios a saúde humana.

Ainda é possível destacar a importância de estudar os méis de abelhas sem ferrão, considerando os diferentes hábitos e necessidades dos meliponídeos (abelhas sem ferrão), podendo produzir méis com características físicas, químicas e nutricionais distintas contribuindo de forma expressiva para a expansão da cadeia produtiva e aumento da renda da agricultura familiar.

## **6 ELETROFORESE CAPILAR: TÉCNICA INSTRUMENTAL AVANÇADA APLICADA EM ANÁLISES DE MEL**

No início dos anos 30, o químico sueco Arne Tiselius, desenvolveu e apresentou a técnica de eletroforese como uma nova

técnica para estudo de proteínas em soro sanguíneo, rendendo ao químico o prêmio Nobel no ano de 1948 (JIMIDAR, 2006). Essa técnica instrumental de separação baseia-se na velocidade de migração de espécies com diferentes cargas ou neutras, através da aplicação de um campo elétrico (SKOOG, 2006). As partículas migram para o ânodo (polo positivo) ou para o cátodo (polo negativo) em função de sua carga específica, e a separação acontece pela diferença entre as mobilidades das espécies carregadas, resultante da razão massa/carga e da estrutura de cada molécula (SKOOG, 2006).

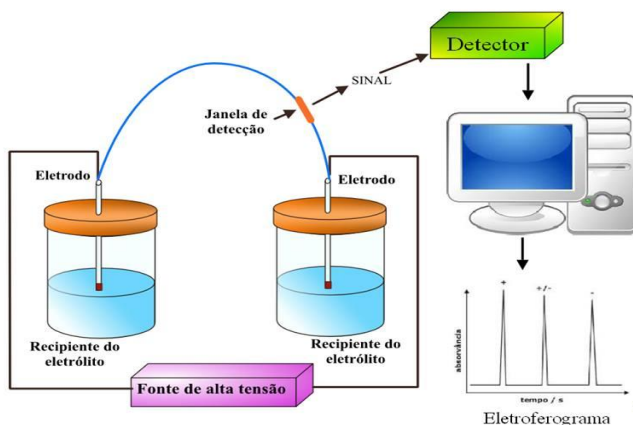
A eletroforese em formato capilar foi desenvolvida na década de 70, despertando interesse na indústria da biotecnologia, no que diz respeito ao sequenciamento do DNA para o Projeto Genoma Humano, além de ser uma técnica aplicável na separação de cátions e ânions inorgânicos, aminoácidos, fármacos, vitaminas, carboidratos, peptídeos, ácidos nucleicos, entre outros (LEWIS; ANASTOS; BARNETT, 2005).

A técnica de eletroforese capilar (do inglês, CE – *Capillary Electrophoresis*) utiliza tubos capilares com formato geométrico (grande área superficial interna comparada ao volume total), apresentando uma grande vantagem, pois permite controlar o efeito Joule de forma eficiente, promovendo a dissipação do calor gerado pela passagem da corrente elétrica. Deste modo, é possível aplicar elevados valores de campo elétrico, obtendo separações de alta eficiência (ROUESSAC; ROUESSAC, 2007) e oferece vantagens em relação a outros métodos de eletroforese, pois permite desenvolver métodos com tempo curto de análise, demanda uma menor quantidade de amostras, reagentes e solventes, consequentemente gerando uma menor quantidade de resíduos (SKOOG, 2006). Além disso, métodos desenvolvidos utilizando a técnica de eletroforese, possuem compatibilidade com vários detectores, como o detector de absorção no UV-Vis e de espectrometria de massa, que faz da EC uma técnica muito versátil (CHENG et al., 2008; SILVA et al., 2008; TAVARES, 1996).

O sistema de EC apresentado na figura 1.8, consiste basicamente em dois eletrodos normalmente de platina, um capilar usualmente de sílica fundida (pois apresentam boa condutividade térmica e transparência na região do UV/Vis) com comprimento variável (geralmente entre 30 e 150 cm) e diâmetro interno entre 15 e 100  $\mu\text{m}$ ; um sistema de detecção e uma fonte de alta tensão podendo funcionar com tensão constante (-30 a 30 kV) ou corrente constante (-

200 a 200  $\mu\text{A}$ ), que estabelecerá o campo elétrico ao longo do capilar (ROUESSAC; ROUESSAC, 2007; RIZELIO, 2011).

Figura 1.8 - Representação esquemática da instrumentação básica de eletroforese capilar.



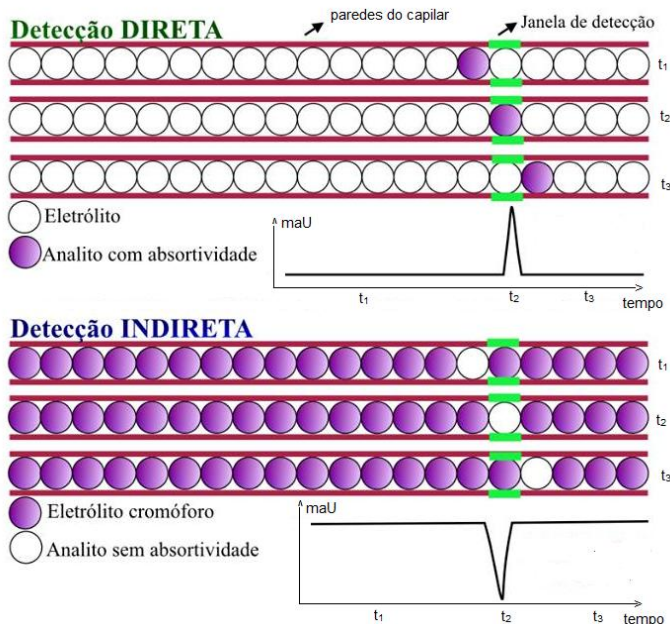
Fonte: adaptado de Valese (2010).

No sistema de CE, a amostra pode ser inserida no capilar de forma hidrodinâmica (aplicação de pressão) ou eletrocinética (aplicação de diferença de potencial). Após a introdução da amostra, o capilar é preenchido com eletrólito de corrida contido nos recipientes do eletrólito idealmente com características tamponantes. As extremidades do capilar e os eletrodos são mergulhados nestes recipientes, fechando o circuito elétrico, e é aplicada uma diferença de potencial, que gera uma corrente elétrica no interior do capilar, promovendo a separação dos compostos, passando pela janela de detecção contida no capilar e posterior detecção (TAVARES, 1996; JIMIDAR, 2006).

A detecção do analito em um equipamento de CE pode ser realizada de maneira direta ou indireta. A detecção direta é limitada aos compostos que possuem absorvidade molar relativamente alta e é baseada na medição direta da absorvância UV/Vis do analito de interesse no momento que este chega à janela de detecção, gerando um sinal (PADARAUSKAS, 2003). Aos compostos que apresentam pouca ou nenhuma absorvidade molar, opta-se pelo uso da detecção indireta. Na detecção indireta, é adicionado um cromóforo ao eletrólito

de corrida, o qual provoca o decréscimo do sinal, que acontece pela passagem do alnalito que não absorve, gerando um sinal alto e constante, que pode ser detectado e relacionado com a concentração do analito permitindo a quantificação pelo uso de curva padrão como referência (JOHNS; MACKA; HADDAD, 2003). A Figura 1.9 demonstra ambos os tipos de detecção.

Figura 1.9 - Representação dos modos de detecção direta e indireta.



Fonte: adaptado de Rizelio (2011).

Outro fator de extrema importância na separação por CE é o fluxo eletrosmótico (EOF). Esse fenômeno ocorre pela presença de grupamentos silanóis (Si-OH) na parede interna do capilar de sílica. Estes grupamentos apresentam caráter ácido, e quando entram em contato com soluções aquosas com pH maior que 3,0, tornam-se ionizados, deixando a parede do capilar com carga negativa (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997). Estes grupos ionizados negativamente atraem os prótons (H<sup>+</sup>) presentes no eletrólito de corrida, formando uma camada de cátions próxima a parede do capilar. Esta camada fina não é suficiente para neutralizar todas as cargas negativas da parede do capilar, então forma-se uma segunda



camada de cátions, que é uma camada móvel. Com a aplicação da diferença de potencial, a camada móvel, juntamente com as moléculas de água que solvatam todos estes íons, migram para o cátodo (polo negativo), gerando o FEO (TAVARES, 1996).

O EOF quando não negligenciável é responsável por arrastar os analitos pelo capilar, induzindo a um fluxo uniforme e sem geração de pressão, resultando em um perfil plano, perpendicular a parede do capilar, que não produz alargamento dos picos em razão do fluxo. Na CE são possíveis dois modos de análises quanto ao FEO: o modo co-eletrosmótico, no qual os analitos migram na mesma direção do FEO e o modo contra-eletrosmótico, onde os analitos migram no sentido contrário do FEO, que em ambos os métodos é o responsável por carregá-los até o detector (TAVARES, 1997).

A técnica de CE pode ser dividida em diferentes modos de separação, que permitem grandes variedades de aplicações desta técnica (SUÁREZ-LUQUE et al., 2006). De acordo com Silva et al. (2007) os métodos podem ser agrupados em: eletroforese capilar de zona; eletroforese capilar de afinidade; eletroforese capilar de peneiramento; eletroforese capilar em gel; focalização isoelétrica capilar; isotacoforese capilar; cromatografia eletrocinética; cromatografia eletrocinética micelar; cromatografia eletrocinética em microemulsão; e eletrocromatografia capilar. Dentre esses, os mais empregados são eletroforese capilar de zona (CZE) e de cromatografia eletrocinética micelar capilar (MEKC).

A técnica de CZE (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*) é uma das mais utilizadas para separações de elementos químicos, devido à facilidade de implementação e otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997). A separação por CZE consiste em aplicar uma diferença de potencial para introduzir a amostra em um tubo capilar na presença de uma solução tampão. Com aplicação de diferença de potencia é gerado um campo elétrico ao longo do capilar (paredes internas) e então os componentes da amostra migram de modo independente uns dos outros, devido às suas diferenças de mobilidade, e com velocidade constante (SILVA et al., 2007).

O modo MEKC (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*) permite a separação de analitos hidrofóbicos, hidrofílicos ou compostos sem carga (TAVARES, 1997). Este método consiste na adição de um agente tensoativo, como o dodecil-sulfato de sódio (SDS), ao eletrólito de corrida, em concentração suficiente para a formação de micelas na solução,

formando um sistema cromatográfico em duas fases. De acordo com sua hidrofobicidade, o analito, sem carga iônica, sofre partição entre estas duas fases, ficando parte livre na solução do eletrólito e parte no interior das micelas. Como as micelas estão carregadas, o analito presente no interior delas será arrastado até o sistema detector (TAVARES, 1997; SILVA et al., 2008; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009).

## **CAPÍTULO 2**

### **MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO (*Meliponinae* spp.): IDENTIDADE E QUALIDADE, COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**



## RESUMO

Neste estudo foram determinados e comparados os padrões de identidade e qualidade (umidade, acidez livre, pH, teor de HMF, atividade diastásica, frutose, glicose, sacarose, condutividade elétrica), bem como a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante de 13 amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) provenientes de três municípios do Estado de Santa Catarina. Quanto aos parâmetros de identidade e qualidade, os méis demonstraram valores que variaram de: umidade 23,02 a 34,11 % m/m; acidez 36,45 a 138,46 meq kg<sup>-1</sup>; pH 3,73 a 5,31; atividade diastásica < 3 a 49,54 un. Göthe; condutividade elétrica 0,15 a 1,34 mS cm<sup>-1</sup>; açúcares: como a frutose 31,11 a 40,20 % (m/m) e glicose 8,20 a 30,98% (m/m); já para sacarose e 5-HMF, os teores foram abaixo dos limites de quantificação (LOQ = 0,074 e 0,31 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) para todas as amostras. As amostras analisadas apresentaram apreciável conteúdo de compostos fenólicos totais (14,69 - 98,04 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) e atividade antioxidante *in vitro* (3,23 a 18,57 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> - DPPH, 64,00 a 666,60 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup> - FRAP e 199,16 a 624,48 µmol TE 100 g<sup>-1</sup> - ORAC), quando comparado aos méis de abelhas *Apis mellifera* descritos na literatura. Este estudo mostra variações significativas nas características das amostras, dependendo da origem geográfica e espécie de abelha. Os resultados obtidos comprovam que as exigências de identidade e qualidade estabelecidas pela legislação brasileira vigente, para o mel de abelha *Apis mellifera*, não atendem à totalidade das características dos méis de abelhas sem ferrão, principalmente para os parâmetros de umidade, açúcares e acidez.

**Palavras-chave:** Mel de melíponas. Identidade. Qualidade. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante.



## 1 INTRODUÇÃO

A apicultura no Brasil teve início na década de 50, quando imigrantes trouxeram abelhas africanas ao país, e estas, cruzaram com diversas espécies formando subespécies híbridas, denominadas abelhas africanizadas (ALVES et al., 2005). Antes, porém, a produção estava restrita às abelhas nativas, as meliponíneas (popularmente chamadas de abelhas indígenas ou sem ferrão), as quais constituem um grupo de abelhas com ferrão atrofiado onde a atividade de produção do mel é hoje chamada de meliponicultura (MONTE et al., 2013).

De acordo com a legislação, o mel é um produto de origem animal, produzido por abelhas melíferas a partir do néctar de flores, ou secretados de partes vivas das plantas ou ainda, de excreções de insetos sugadores de plantas, dos quais as abelhas coletam, transformam, combinam e maturam nos favos das colméias (BRASIL, 2000). Pode ser definido, também, como fluido viscoso, aromático e doce, uma solução concentrada de açúcares, predominando a glicose e frutose, contendo ainda uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, pigmentos e grãos de pólen (BRASIL, 2000; VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

As características físicas e químicas do mel são determinadas por uma série de fatores, que em conjunto estabelecem a qualidade do mel produzido. Dentre estes fatores, podem ser citados, o tipo de solo, as condições climáticas, estágio de maturação, espécie de abelha, estado fisiológico da colônia, processamento, armazenamento, fraudes e principalmente da fonte e da origem floral do néctar recolhido pelas abelhas (PONTES, MARQUES; CAMARA, 2007; SILVA; QUEIROZ; FIGUEIREDO, 2004).

Em função dessas condições, estabeleceram-se padrões de identidade e qualidade para o mel, através da Instrução Normativa nº 11/00. Esta define alguns requisitos mínimos, que servirão de padrão, como maturidade (açúcares redutores, umidade, sacarose aparente), pureza (sólidos insolúveis em água, cinzas, pólen) e deterioração (acidez livre, atividade diastásica e hidroximetilfurfural) (BRASIL, 2000).

Apesar da Instrução Normativa nº 11/00 não especificar para qual espécie de abelha refere-se a padronização e qualidade do mel, sabe-se que tal Instrução foi baseada em normatizações internacionais (*Codex alimentarius* e Mercosul) específicas para mel de *Apis mellifera*. Estudos realizados, para caracterizar o mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.), têm demonstrado que alguns requisitos, como umidade, acidez e açúcares, encontraram-se em desacordo com o que a

legislação preconiza, por outro lado, tais resultados apresentam-se similares a outros trabalhos que caracterizaram o mel de abelhas sem ferrão (BRASIL, 2000; FONSECA et al., 2006; GERRINI et al., 2009; NOGUEIRA-NETO, 1997; SOUZA et al., 2009a; SILVA et al., 2013a). Supõem-se, desta forma, que tais parâmetros estabelecidos pela legislação sejam aplicados somente ao mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), demandando, neste sentido, mais estudos no que diz respeito à caracterização do mel de abelhas sem ferrão e uma futura legislação.

Mais que um produto açucarado e de sabores inigualáveis, o mel é, há muitos anos reconhecido por ter propriedades terapêuticas, sendo um importante ingrediente da gastronomia ou da medicina popular (FERREIRA et al., 2009; BERETTA et al., 2005). Recentemente, tem-se valorizado o seu potencial como alimento natural antioxidante, devido à presença de compostos bioativos como; flavonoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides, catalase, peroxidase, e alguns produtos da reação de Maillard, como o 5-HMF (BALTRUŠAITYTĖ; VENSKUTONIS; ČEKŠTERYTĖ, 2007; BERTONCELJ et al., 2007; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010).

Sabe-se que estudos sobre o mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) ainda são recentes e que as características físicas, químicas e nutricionais são associadas ao mel de abelha *Apis mellifera*, exigindo-se os mesmos parâmetros de identidade e qualidade. Assim, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização de amostras de mel de abelhas sem ferrão de três diferentes municípios do Estado de Santa Catarina, considerando os parâmetros de identidade e qualidade, a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante nas amostras, apresentando sua diferença em relação à legislação brasileira que preconiza o mel de abelha *Apis mellifera*, servindo como subsidio para impulsionar seu consumo e incentivar cadeia de produção para a meliponicultura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os reagentes tetraborato de sódio (TBS), dodecil-sulfato de sódio (SDS), ácido sórbico, brometo de cetil-trimetil-amônio (CTBA), cafeína, Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-



carboxílico (Trolox) e os padrões, 5-hidroxiacetilfulfural (5-HMF), fosfato de monossódio monohidratado, foram obtidos da Sigma Aldrich (Santa Ana, E.U.A), 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) e fluoresceína sódica foram obtidos da Fluka Analytical.

Os reagentes, hidróxido de sódio, cloreto de sódio, acetato de sódio, amido, iodo, ácido ascórbico, cloreto férrico, sulfato ferroso, ácido gálico, carbonato de sódio, frutose, glicose, sacarose e o solvente metanol foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A água utilizada foi filtrada por sistema de desionização (deionizador Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA).

Os principais instrumentos utilizados foram: condutivímetro Tec-4MP (TECNAL), pHmetro DM-20 (Digimed), espectrofotômetro HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK), eletroforese capilar modelo 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, E.U.A), e leitor de microplacas Synergy™ Mx (BioTek, Winooski, VT, USA), ultrassom (Cristófoli), centrífuga MiniSpin plus (Eppendorff), balança analítica AB204-S (Mettler Toledo), purificador de água Simplicity UV (sistema Milli - Q, Millipore, Bedford, MA, EUA), O *software* HP ChemStation e Statistic 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) foram utilizados para aquisição de dados e tratamento.

## 2.2 Amostras

Foram analisadas treze amostras de mel, obtidas através de uma parceria com meliponicultores de Santa Catarina. As amostras foram coletadas entre os meses de outubro de 2012 e maio de 2013, provenientes de três municípios do Estado de Santa Catarina: sendo quatro amostras de Florianópolis, uma de Santo Amaro da Imperatriz e sete de São Miguel do Oeste, todas as amostras originárias de floradas silvestres. A descrição das espécies, a posição geográfica e a localização dos municípios estão descritas na Tabela 2.1 e na Figura 2.1. As informações foram descritas pelos meliponicultores (Engenheiro agrônomo Pedro F. Gonçalves/Sítio Flor de Ouro e Cleumar Liebert) e técnicos da EPAGRI-SC (Carlos A. Paganini). Todas as amostras foram armazenadas em frascos plásticos, ao abrigo da luz, e sob refrigeração (gelo) e transportadas até o Laboratório de Química de Alimentos do CCA – UFSC, onde foram mantidas em temperatura de  $-18 \pm 2$  °C até o momento das análises.

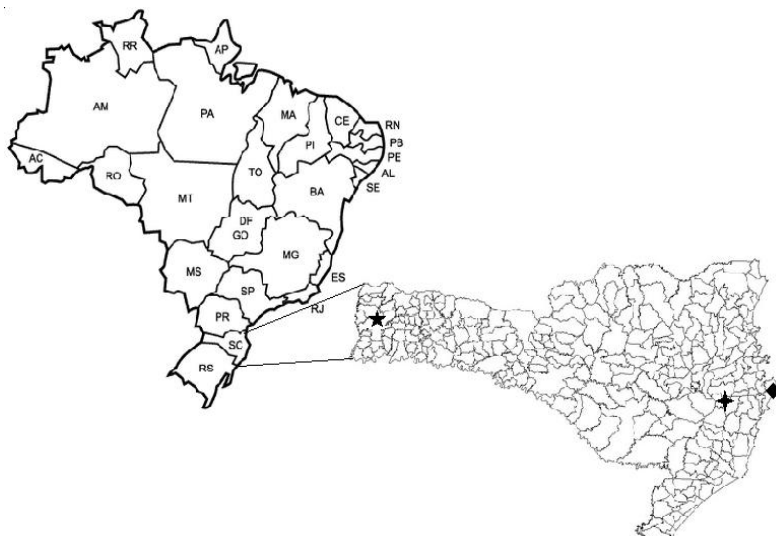
Tabela 2.1 – Identificação das espécies de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) e descrição geográfica dos municípios de origem das amostras.

<b>Amostra</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Origem</b>	<b>La.</b>	<b>Lo.</b>	<b>Al.</b>
<b>A</b>	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	FLN	27°35'49''	48°32'56''	0
<b>B</b>	Tujuba	<i>Melipona mondury</i>	FLN	27°35'49''	48°32'56''	0
<b>C</b>	Guaraipo	<i>Melipona bicolor</i>	FLN	27°35'49''	48°32'56''	0
<b>D</b>	Manduri	<i>Melipona marginata</i>	FLN	27°35'49''	48°32'56''	0
<b>E</b>	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	SAI	27°41'18''	48° 46'45''	19
<b>F</b>	Manduri	<i>Melipona marginata</i>	SMO	26°43'08"	53°31'18"	676
<b>G</b>	Vorá ou Borá	<i>Tetragona clavipes</i>	SMO	26°43'08"	53°31'18"	676
<b>H</b>	Jataí	<i>Tetragonisca angustula</i>	SMO	26°42'51"	53°30'53"	680
<b>I</b>	Guaraipo	<i>Melipona bicolor</i>	SMO	26°43'08"	53°31'18"	676
<b>J</b>	Uruçu Nordestina	<i>Melipona scutellaris</i>	SMO	26°43'08"	53°31'18"	676
<b>K</b>	Tubuna	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	SMO	26°43'08"	53°31'18"	676
<b>L</b>	Uruçu Amarela	<i>Melipona rufivestris</i>	SMO	26°43'08"	53°31'18"	676
<b>M</b>	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	SMO	26°43'08"	53°31'18"	676

\***Município:** FLN= Florianópolis, SAI= Santo Amaro da Imperatriz, SMO = São Miguel do Oeste. \***La** = latitude, \***Lo** = longitude, \***Al** =Altitude (m).

Fonte: próprio autor.

Figura 2.1- Mapa de Santa Catarina com a localização das amostras de abelhas sem ferrão estudadas. Municípios de Florianópolis (◆ amostra A-D), Santo Amaro da Imperatriz (✦ amostra E) e São Miguel do Oeste (★ amostra F-M).



Fonte: adaptado do IBGE (2013).

### 2.3 Parâmetros de identidade e qualidade

Todas as amostras preparadas em triplicatas e analisadas conforme descrito a seguir.

O conteúdo de umidade foi determinado com base no método refratométrico, aonde o índice de refração (IR) das amostras de mel foi determinado a temperatura ambiente usando um refratômetro de Abbé. Levando em consideração que o IR das substâncias depende da temperatura e da concentração, geralmente a leitura no refratômetro é padronizada a 20°C. A correção do índice de refração para amostras com temperaturas diferentes de 20 °C, é realizada com a adição de um fator de correção de 0,00023 ao índice de refração, para cada grau acima de 20 °C ou subtração 0,00023 do índice de refração para cada grau abaixo de 20°C. As leituras obtidas foram então corrigidas para a temperatura padrão através do fator de correção (AOAC, 2005).

O teor de umidade correspondente ao índice de refração obtido no refratômetro de Abbé, devidamente ajustado para a temperatura, foi

calculado através da equação de Wedmore:  $W_{wed} = -2681 - \log (IR - 1)/0,002243$ , onde  $W_{wed}$  corresponde ao teor de umidade de Wedmore e  $IR$  ao índice de refração. Os resultados expressos em % (m/m) (Wedmore, 1955).

O método de determinação de acidez fundamenta-se na neutralização de uma massa conhecida de mel por uma solução padronizada de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  até pH 8,5. Alíquotas de 1 g de amostra de mel foram diluídas em 75 mL de água desionizada sob agitação magnética. Com o auxílio de um pHmetro foi verificado o valor inicial do pH da amostra. Para a determinação da acidez livre, esta solução foi titulada com NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  até alcançar pH 8,5. O valor da acidez livre foi calculado com auxílio da equação:  $\text{acidez livre} = (v \times f \times 100) / m$ , sendo que  $v$  corresponde ao volume (mL) de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação da amostra,  $f$  é o fator de correção da solução de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $m$  é a massa da amostra (g) utilizada na análise. Os valores foram expressos em  $\text{mEq kg}^{-1}$  (AOAC, 2005).

Os açúcares, frutose, glicose e sacarose foram determinados segundo Rizelio et al. (2012a) através do método indireto de EC, com eletrólito de corrida, composto de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido sórbico,  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de CTAB e  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaOH, em pH 12,2. O capilar utilizado continha 60 cm de comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo e  $50 \mu\text{m}$  de diâmetro interno. A injeção foi realizada pelo modo hidrodinâmico (-50 mbar, 3 s), e a voltagem aplicada foi de 25 kV. A temperatura mantida a  $25^\circ\text{C}$ , e a detecção indireta em 254 nm. Os resultados foram expressos em % m/m.

A atividade diastásica foi determinada de acordo com o método sugerido pela AOAC (2005). Massas de 1 g de mel foram diluídas em 10 mL de água desionizada, tamponadas com 2,5 mL de tampão acetato  $1,60 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,3) e transferidas para um balão volumétrico de 25 mL contendo 1,5 mL de NaCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . O volume então foi completado com água desionizada. Transferiu-se para um tubo de ensaio 5 mL desta solução, o qual foi mantido em banho-maria a  $40^\circ\text{C}$  juntamente com um segundo tubo de ensaio contendo solução de amido 1 %. Após 15 minutos, 2,5 mL da solução de amido foram transferidos para o tubo contendo a solução de mel, com agitação e cronometragem do tempo. Após 5 minutos, 0,25 mL da mistura foram combinados com 2,5 mL de uma solução de iodo  $0,00035 \text{ mol.L}^{-1}$  e com o volume de água desionizada requerido para que a absorbância inicial a 660 nm fosse  $0,760 \pm 0,02$ . A reação foi repetida em intervalos de 5 minutos até que a absorbância atingisse 0,235 ou menos. Com os valores obtidos, foi construído um gráfico da absorbância *versus* o tempo, para o

cálculo de tx, que é o tempo (minutos) necessário para atingir a absorbância de 0, 235. O quociente 300/tx resultou na atividade diastásica, expressa em mL de solução de amido 1 %, hidrolisada por hora pela enzima presente em 1 g de mel, em unidades Göthe (AOAC, 2005).

O conteúdo de HMF foi determinado segundo metodologia descrita por Rizelio et al. (2012b), utilizando eletroforese capilar através do método de MEKC e expresso em mg kg<sup>-1</sup>. As condições do método foram: eletrólito de corrida, composto de TBS 5 mmol L<sup>-1</sup> e SDS 120 mmol L<sup>-1</sup>, em pH 9,3; capilar de 32 cm de comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; injeção por modo hidrodinâmico a -50 mbar durante 3 segundos; voltagem de -15 kV; temperatura de 25 °C; e detecção direta em 284 nm.

A condutividade elétrica foi determinada em solução de mel a 20% (m/v) em água desionizada, a 25°C, com auxílio de condutivímetro. Os resultados foram obtidos diretamente no equipamento e expressos em mS cm<sup>-1</sup> (BOGDANOV, 1999).

## 2.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante em mel

Para avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais foi aplicado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), onde, alíquotas de 100 µL de uma solução aquosa de mel (0,2 g mL<sup>-1</sup>) foram homogeneizadas com 2 mL de água desionizada e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em balão volumétrico de 10 mL. Após foram adicionados 1,5 mL de solução de carbonato de sódio 20 % (m/v), o volume aferido com água desionizada com posterior homogeneização. A solução permaneceu ao abrigo de luz por 2 horas, em temperatura ambiente, com posterior medida da absorbância em espectrofotômetro a 764 nm. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi calculado por comparação com uma curva padrão construída usando padrão de ácido gálico (50 – 300 mg L<sup>-1</sup>), e expresso em miligramas de equivalente a ácido gálico mg EAG 100 g<sup>-1</sup> de mel.

A atividade antioxidante, referente às substâncias presentes nos méis foi quantificada através de três métodos baseados em diferentes princípios e condições experimentais: o método de sequestro de radicais do DPPH, de acordo com Brand-Williams, Cuverlier e Berset (1995), o método do poder redutor FRAP, descrito por Benzie e Strain (1996), modificado por Bertoncelj et al. (2007) e o método de remoção de um radical peroxil ORAC, de acordo com o método Fernandes et al. (2004) com modificações de Huang et al. (2002). A solução das amostras

utilizadas nas determinações de: fenólicos totais, DPPH e FRAP foram preparadas com 2,5 g de mel diluídos com água desionizada e avolumados para 25 mL. Para a análise de ORAC, foram utilizados volumes de 25 µL de amostra por injeção direta, sem a necessidade de diluição.

O radical DPPH foi preparado, na concentração de 0,1 mmol L<sup>-1</sup>, em metanol. Essa solução foi diluída na proporção 1:100, em metanol 80 % v/v, até a absorbância inicial de 0,800 em 515 nm. Em uma série de três (células de 1 cm de caminho ótico), foram lidas as absorbâncias de 2,9 mL da solução de DPPH (A<sub>0</sub>) e, em seguida, adicionados 100 µL da solução de mel a cada célula. A mistura foi homogeneizada e mantida ao abrigo da luz por 30 minutos, em temperatura ambiente e logo após as absorvâncias foram novamente medidas (A<sub>30</sub>). Provas em branco (3) foram realizadas, utilizando somente água desionizada em substituição a solução de mel. As porcentagens de inibição dos radicais foram calculadas através da equação: % = (1 - A<sub>30</sub>/A<sub>0</sub>) x 100. Uma curva padrão foi preparada aplicando ácido ascórbico (0 - 100 mg L<sup>-1</sup>), e os resultados expressos em miligramas equivalentes a ácido ascórbico mg EAA 100 g<sup>-1</sup> de mel (BRAND-WILLIAMS; CUVERLIER; BERSET, 1995).

O reagente de FRAP consiste em uma solução contendo uma parte de TPTZ 10 mmol L<sup>-1</sup> em HCl 40 mmol L<sup>-1</sup>, uma parte de FeCl<sub>3</sub> 20 mmol L<sup>-1</sup>, e dez partes de tampão acetato de sódio 0,3 mol.L<sup>-1</sup>, pH 3,6, preparado diariamente. Triplicatas de alíquotas de 200 µL da solução de mel foram adicionadas de 1,8 mL do reagente de FRAP e mantidas ao abrigo da luz por 10 minutos em banho-maria a 37 °C. A seguir as absorvâncias foram medidas a 594 nm e calculados frente a um padrão aquoso de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0 - 750 µmol L<sup>-1</sup>) aplicado como padrão na preparação da curva, e os resultados obtidos, expressos em µmols equivalentes a Fe (II).100 g<sup>-1</sup> de mel (BENZIE; STRAIN, 1996; BERTONCELJ et al., 2007).

O ensaio de ORAC foi utilizado microplacas, onde, 25 µL de amostra foram homogeneizadas com 150 µL de fluoresceína (61,2 nmol L<sup>-1</sup>), e incubadas por 10 min a 37 °C, com 3 min de agitação, após o tempo de 10 minutos, foram adicionados às microplacas 25 µL de solução de AAPH (19 mmol L<sup>-1</sup>) iniciando a reação. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4 e o volume final da mistura foi de 200 µL. A intensidade de fluorescência (excitação= 485 nm/20 nm e emissão = 528/20 nm) foi verificada em modo cinético, com leitura em intervalos de 1 min, até que o valor da fluorescência seja menor ou igual a 0,5 % da fluorescência inicial e a

atividade antioxidante ORAC foi expressa  $\mu\text{mol}$  de equivalente trolox por 100g de mel ( $\mu\text{mol TE } 100\text{g}^{-1}$  de mel) (FERNANDES et al., 2004; HUANG et al., 2002). TROLOX foi usado como controle positivo.

## 2.5 Análise Estatística

O *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, E.U.A) foi utilizado para auxiliar o tratamento dos dados obtidos. Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras de mel, e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As médias de cada região foram então submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para verificar diferenças entre as médias, sendo que diferenças ao nível de 95% ( $p < 0,05$ ) foram consideradas estatisticamente significantes.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Parâmetros de identidade e qualidade

Os resultados encontrados para a caracterização das amostras de mel de abelhas sem ferrão estão serão apresentados e discutidos a seguir.

Na Tabela 2.2 estão apresentados os resultados dos parâmetros de identidade e qualidade das amostras analisadas, incluindo: umidade, condutividade elétrica, acidez, pH.

Tabela 2.2 – Características físico-químicas determinadas nas amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.)

Amostra	Umidade % (m/m)	Condutividade elétrica (mS cm <sup>-1</sup> )	Acidez livre (meq kg <sup>-1</sup> )	pH
<b>A</b>	33,78 ± 0,25 <sup>i</sup>	0,529 ± 0,00 <sup>f</sup>	36,45 ± 1,63 <sup>b</sup>	4,29 ± 0,10 <sup>e</sup>
<b>B</b>	29,56 ± 0,24 <sup>f</sup>	0,536 ± 0,00 <sup>f</sup>	109,16 ± 4,76 <sup>g</sup>	3,81 ± 0,05 <sup>a,b</sup>
<b>C</b>	32,65 ± 0,00 <sup>h</sup>	0,617 ± 0,00 <sup>g</sup>	138,46 ± 3,81 <sup>j</sup>	3,81 ± 0,00 <sup>a,b</sup>
<b>D</b>	32,79 ± 0,25 <sup>h</sup>	0,701 ± 0,01 <sup>i</sup>	120,14 ± 2,55 <sup>i</sup>	4,00 ± 0,06 <sup>d</sup>
<b>E</b>	27,52 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,36 ± 0,00 <sup>d</sup>	48,71 ± 1,21 <sup>d</sup>	4,26 ± 0,02 <sup>e</sup>
<b>F</b>	34,11 ± 0,49 <sup>i</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>e</sup>	115,57 ± 0,41 <sup>h</sup>	3,82 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
<b>G</b>	25,19 ± 0,24 <sup>c</sup>	1,01 ± 0,02 <sup>j</sup>	91,24 ± 1,09 <sup>f</sup>	4,28 ± 0,03 <sup>e</sup>
<b>H</b>	23,83 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,01 <sup>l</sup>	50,92 ± 0,92 <sup>d</sup>	5,31 ± 0,02 <sup>h</sup>
<b>I</b>	28,77 ± 0,00 <sup>e</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>d</sup>	108,35 ± 2,40 <sup>g</sup>	3,73 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>J</b>	23,43 ± 0,41 <sup>a,b</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>a</sup>	28,66 ± 1,23 <sup>a</sup>	4,52 ± 0,03 <sup>f</sup>
<b>k</b>	23,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,00 <sup>h</sup>	41,19 ± 0,33 <sup>c</sup>	4,75 ± 0,02 <sup>g</sup>
<b>L</b>	27,66 ± 0,24 <sup>d</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>b</sup>	38,19 ± 1,19 <sup>b,c</sup>	4,20 ± 0,01 <sup>e</sup>
<b>M</b>	30,86 ± 0,00 <sup>g</sup>	0,29 ± 0,00 <sup>c</sup>	74,77 ± 0,91 <sup>e</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>b,d</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão.

<sup>a,b,c,d,f,g,h,e</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05).

Letras de A-M: espécies de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1.

Fonte: próprio autor



Foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas em todos os parâmetros analisados.

O conteúdo de umidade encontrado nas amostras analisadas variou entre 23,02 a 34,11 % (m/m). Os resultados apresentados na Tabela 2.2, indicam diferença estatística significativa para os teores de umidade, tanto em amostras de méis de abelhas da mesma espécie, em municípios distintos (A, E, M), quanto para méis produzidos nas mesmas localidades por abelhas de espécies diferentes. Todas as amostras apresentaram valores superiores aos preconizados pela legislação brasileira, que visa para o mel de abelha *Apis mellifera* no máximo 20% (m/m). A diferença no teor de umidade comparando ao mel de *Apis mellifera* pode ser devido à baixa taxa de desidratação do néctar durante o processamento de transformação do mel, entre outros fatores, como coletas de néctar das flores mais rasteiras e de frutos maduros mais ricos em água ou as diferentes espécies de abelha (BEJLSMA et al., 2006; FINOLA et al., 2007; VIT; PULCINI, 1996; VIT, 1994; VIT; MEDINA; ENRIQUEZ, 2004).

Valores semelhantes nos teores de umidade foram descritos por Silva et al. (2013a) e Guerrini et al. (2009), que apontam valores de 22,30 a 34,10 % (m/m) respectivamente. Os pesquisadores ainda relatam que, mesmo em climas secos e com todos os cuidados necessários em relação ao manejo, o mel de abelhas sem ferrão permanece com umidade elevada, apresentando-se diferente do mel de *Apis mellifera* (AVES et al., 2005; VILAS-BOAS et al., 2012). Dessa forma, altos níveis de umidade em mel de *Meliponinae* spp. devem ser avaliados com atenção, pois afetam outras características como: viscosidade, fluidez e principalmente a conservação, exigindo assim maiores cuidados no momento da colheita e armazenamento. Além disso, o alto nível de umidade presente no mel de abelhas sem ferrão deve receber maior atenção, pois é uma das principais propriedades que o diferencia, e o torna suscetível a fraudes por adição de água (SILVA et al., 2013a).

Os valores para condutividade elétrica encontrados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão variaram entre 0,15 - 1,34 mS cm<sup>-1</sup>, apresentando grande variabilidade entre as espécies. A amostra da espécie J (*Melipona scutellaris*) apresentou o menor valor, e as amostras G (*Tetragona clavipes*) e H (*Tetragonisca angustula angustula*) os maiores valores, no entanto, as três amostras são da mesma região de coleta e de espécies distintas.

As amostras A, E, M, produzidas por abelhas da mesma espécie e alocadas em regiões distintas, também apresentaram diferenças estatísticas significativas, contrariando estudos anteriores, os quais relatam que o mel com a mesma origem floral, deve possuir condutividade elétrica semelhante, mesmo produzida em condições edafoclimáticas distintas e por espécies diferentes de abelhas sem ferrão, podendo a condutividade elétrica, portanto, ser considerada como um dos critérios para a determinação da origem botânica do mel (FEAS et al., 2010; GUERRINI et al., 2008; TERRAB et al., 2004).

Outros autores relataram encontrar valores de condutividade elétrica bastante variáveis entre amostras de mel de abelhas sem ferrão: 0,53 a 0,80 mS cm<sup>-1</sup> para méis de abelha *Melipona scutellaris* de diferentes municípios do estado de Pernambuco; 1,06 - 2,70 mS cm<sup>-1</sup> para méis de *Tetragonisca angustula latreille* do município de Piracicaba, estado de São Paulo; 0,33 a 0,90 mS cm<sup>-1</sup> para méis de abelha *Melipona scutellaris* de diferentes municípios do estado da Bahia; 0,35 a 0,87 mS.cm<sup>-1</sup> para méis de abelha *Melipona asilvai*, também de diferentes municípios do estado da Bahia (ANACLETO, et al., 2009; CAMPOS; GOIS; CARNEIRO 2010; SOUZA et al., 2009b).

A acidez livre determinada nas amostras analisadas, apresentou valores entre 28,66 e 138,46 mEq kg<sup>-1</sup> (Tabela 2.2). Os valores apontaram uma grande variação nos níveis de acidez, quando relacionamos cada espécie, com as amostras das espécies J e A apresentando os menores valores, e as amostras da espécie C e D, apresentaram os maiores valores. Esta diferença de acidez do mel deve-se provavelmente à possível variação dos tipos de ácidos orgânicos presentes nas diferentes fontes de néctar, pela ação das enzimas mandibulares das abelhas, como a enzima glicose-oxidase que origina o ácido glucônico (OLIVEIRA; SANTOS, 2011).

Segundo os parâmetros de qualidade do mel vigente na legislação brasileira (BRASIL, 2000), o valor máximo para acidez livre é 50 meq kg<sup>-1</sup>, dessa forma, 60% das amostras analisadas se apresentaram em desacordo com a legislação, havendo a necessidade de ressaltar que a legislação preconiza méis de abelha *Apis mellifera* e que os meles de abelhas sem ferrão vêm se apresentando como um produto diferenciado com necessidade urgente de parâmetros específicos e mais abrangentes permitindo assim sua adequação a comercialização com garantia de identidade e qualidade. Outros estudos realizados em méis de abelhas sem ferrão também apontam grande variação de acidez livre com relação às espécies de abelhas sem ferrão produtoras de mel. Silva et al. (2013) apresentam valores de 24,5 a 93,5 meq kg<sup>-1</sup> para méis de

abelha *Melipona subnitida*, produzido no estado da Paraíba. Estudos de Sousa, et al. (2013) demonstram valores de 27,46 a 86,23 meq kg<sup>-1</sup> para méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão produzidos no estado de Rio Grande do Norte.

Todas as amostras analisadas apresentaram caráter ácido, típico do mel, com valores de pH variando entre 3,73 - 5,31 (Tabela 2.2). Valores semelhantes também foram encontrados nos méis de abelhas sem ferrão, produzidos no estado da Paraíba (2,9 a 3,83) no estado Rio Grande do Norte (3,5 a 5,1) e no estado do Maranhão (3,3 a 4,6) (HOLANDA OLIVEIRA; COSTA, 2012; SOUSA et al., 2013; SILVA et al., 2013). O pH e a acidez são considerados importantes fatores antimicrobianos, proporcionando uma maior estabilidade ao produto. Estes parâmetros são também importantes para definir a forma de manejo e armazenamento do mel, considerando sua influencia na estabilidade e vida de prateleira (GUERRINI et al., 2009; ALVES et al., 2012).

Outros parâmetros importantes e exigidos pela legislação vigente são os teores de 5-HMF e atividade diastásica. Os resultados obtidos pra esses parâmetros esta expostos na tabela 2.3

Tabela 2.3 – Conteúdo de 5-HMF e atividade diastásica determinados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.).

Amostra	HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Diastase (un. Göthe)
A	< LOQ	17,29 ± 0,22 <sup>a</sup>
B	< LOQ	< 3
C	< LOQ	< 3
D	< LOQ	< 3
E	< LOQ	< 3
F	< LOQ	< 3
G	< LOQ	19,04 ± 0,42 <sup>b</sup>
H	< LOQ	49,54 ± 0,07 <sup>c</sup>
I	< LOQ	< 3
J	< LOQ	< 3
K	< LOQ	4,34 ± 1,10 <sup>d</sup>
L	< LOQ	< 3
M	< LOQ	< 3

Valores expressos como média ± desvio padrão). <sup>a,b,c,d</sup>. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05).

LOQ – Limite de quantificação (0,31 mg L<sup>-1</sup>) na curva de calibração.

Letras de A-M: espécies de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1.

Fonte: próprio autor

O 5-hidroximetilfulfural (5-HMF) apresentou-se abaixo do LDQ ( $0,31 \text{ mg L}^{-1}$  na curva de calibração) para todas as amostras de mel analisadas. A atividade diastásica das amostras apresentou valores entre  $< 3$  e 49,54 unidades Göthe, com variação expressiva entre as espécies (Tabela 2.3). Considerando estes dois parâmetros como indicadores de frescor do mel e de possível aquecimento ou armazenamento prolongado ou inadequado, é possível destacar as amostras analisadas como de excelente procedência, por atenderem as exigências da legislação nacional para mel de *Apis mellifera*, apresentando níveis de HMF inferiores a  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  e diastase superiores a 8 unidades Göethe ou ainda para méis com baixo conteúdo enzimático, ter no mínimo uma atividade diastásica correspondente igual ou superior a 3 na escala de Göthe, sempre que o conteúdo de 5-HMF não exceda a  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  (BRASIL, 2000; BARONI et al., 2009).

Os principais açúcares encontrados no mel são glicose e frutose, em proporções semelhantes, sendo importantes para o estabelecimento de uma série de características. Normalmente, a frutose é predominante nos méis de abelhas sem ferrão, sendo responsável pela intensidade do sabor doce e a alta higroscopicidade, podendo manter o mel líquido por um longo período ou nunca cristalizar (CRANE, 1985). Os resultados de concentração de açúcares frutose, glicose e sacarose, nas amostras de mel de abelha sem ferrão, estão apresentados na tabela 2.4

Tabela 2.4 – Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose e sacarose encontrados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.).

Amostra	Frutose	Glicose	F+G	F/G	Sacarose
<b>A</b>	34,97 ± 0,80 <sup>d,e</sup>	27,25 ± 0,09 <sup>c</sup>	62,21 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,01 <sup>d</sup>	< LOQ
<b>B</b>	36,37 ± 0,15 <sup>f</sup>	29,45 ± 0,13 <sup>g</sup>	65,81 ± 0,29 <sup>c</sup>	1,24 ± 0,00 <sup>a</sup>	< LOQ
<b>C</b>	32,46 ± 0,22 <sup>b</sup>	29,46 ± 0,16 <sup>g</sup>	61,92 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,00 <sup>c</sup>	< LOQ
<b>D</b>	34,68 ± 0,15 <sup>d</sup>	26,41 ± 0,15 <sup>c</sup>	61,09 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,00 <sup>d</sup>	< LOQ
<b>E</b>	38,38 ± 0,12 <sup>g</sup>	30,98 ± 0,06 <sup>h</sup>	69,36 ± 0,17 <sup>c</sup>	1,24 ± 0,00 <sup>a</sup>	< LOQ
<b>F</b>	33,45 ± 0,25 <sup>c</sup>	28,20 ± 0,14 <sup>f</sup>	61,65 ± 0,39 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,00 <sup>b</sup>	< LOQ
<b>G</b>	40,20 ± 0,64 <sup>h</sup>	8,20 ± 0,20 <sup>a</sup>	48,59 ± 0,84 <sup>d</sup>	4,79 ± 0,04 <sup>l</sup>	< LOQ
<b>H</b>	36,11 ± 0,29 <sup>f</sup>	21,23 ± 0,20 <sup>b</sup>	57,34 ± 0,49 <sup>b</sup>	1,70 ± 0,00 <sup>g</sup>	< LOQ
<b>I</b>	31,54 ± 0,20 <sup>a</sup>	26,18 ± 0,33 <sup>c</sup>	57,72 ± 0,51 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	< LOQ
<b>J</b>	36,38 ± 0,36 <sup>f</sup>	26,32 ± 0,28 <sup>c</sup>	62,70 ± 0,64 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,00 <sup>h</sup>	< LOQ
<b>K</b>	31,11 ± 0,24 <sup>a</sup>	26,96 ± 0,13 <sup>d,e</sup>	58,07 ± 0,37 <sup>b</sup>	1,15 ± 0,00 <sup>i</sup>	< LOQ
<b>L</b>	35,59 ± 0,12 <sup>e,f</sup>	29,96 ± 0,08 <sup>g</sup>	65,55 ± 0,15 <sup>c</sup>	1,19 ± 0,01 <sup>b</sup>	< LOQ
<b>M</b>	31,88 ± 0,19 <sup>a,b</sup>	26,46 ± 0,17 <sup>c,d</sup>	58,34 ± 0,63 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,00 <sup>b</sup>	< LOQ

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c,d,f,g,h</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). F+G – soma dos conteúdos de frutose e glicose; F/G – razão entre os conteúdos de frutose e glicose;

LOQ – limite de quantificação (0,074 mg L<sup>-1</sup> sacarose) na curva de calibração.

Letras de A – M = espécies de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1.

Fonte: próprio autor

O conteúdo de açúcares, frutose e glicose, encontrados nas amostras de mel analisados variaram entre 31,11 a 40,20 e 8,20 a 30,98% (m/m) respectivamente, mostrando que o conteúdo de frutose é maior de que o de glicose em méis de abelhas sem ferrão. Os resultados mostraram também, uma grande variação entre as espécies, onde, a amostra G apresentou o maior valor de frutose e o menor valor de glicose, totalizando 48,59% (m/m). Na soma dos conteúdos de frutose e glicose dez amostras foram inferiores a 65% (m/m), que é o limite mínimo estabelecido para o conteúdo de açúcares redutores em méis de abelha *Apis mellifera* (BRASIL, 2000). Essa diferença pode ser atribuída às características diferenciadas desse mel, que contém um alto teor de umidade ou de certa forma, um produto menos concentrado, ou até mesmo pela presença de outros açúcares não estudados.

O tempo necessário para o mel cristalizar depende principalmente da razão entre frutose e glicose (F/G), ou seja, méis com alta razão frutose/glicose podem permanecer fluidos por mais tempo, esse fato também deve levar em consideração a quantidade de água presente no mel, pois a frutose tem solubilidade maior do que a glicose (AL et al., 2009; ESCUREDO, 2014). Estudos ainda apontam que amostras que permanecem fluídas por muito tempo ou não cristalizam, apresentam razão maior que 1,33 (ESCUREDO, 2014).

A taxa de frutose/glicose para as amostras de mel de abelhas sem ferrão analisadas, apresentaram valores acima de 1 indicando a fluidez das amostras (AL et al., 2009). A amostra G apresentou o maior valor entre todas as amostras analisadas, com razão frutose/glicose de 4,79, apresentando maior fluidez o que foi confirmado visualmente. Quanto ao teor de sacarose, todos os resultados obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação do método, estando todas as amostras de acordo com a legislação vigente para mel de *Apis mellifera* (menor que  $6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (BRASIL, 2000).

### 3.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os valores encontrados para o conteúdo de compostos fenólicos totais e para a atividade antioxidante (ORAC, DPPH e FRAP), das amostras de mel de abelha sem ferrão, podem ser observados na Tabela 2.5. Há diferenças significativas entre as amostras, ao nível de 95% de confiabilidade.

Tabela 2.5 – Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.).

Amostra	Fenólicos totais (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )	ORAC (μmol TE 100 g <sup>-1</sup> )	DPPH (mg EAA 100 g <sup>-1</sup> )	FRAP (μmol Fe II 100 g <sup>-1</sup> )
<b>A</b>	15,86 ± 0,65 <sup>a</sup>	207, 41 ± 7,00 <sup>a</sup>	3,23 ± 0,09 <sup>a</sup>	69,78 ± 0,37 <sup>a</sup>
<b>B</b>	26,45 ± 0,98 <sup>c</sup>	350,89 ± 5,00 <sup>b</sup>	4,17 ± 0,03 <sup>a,b,c</sup>	89,82 ± 0,98 <sup>b</sup>
<b>C</b>	19,23 ± 0,12 <sup>b</sup>	232,38 ± 20,00 <sup>a</sup>	4,67 ± 0,01 <sup>b,c,d</sup>	64,00 ± 1,02 <sup>a</sup>
<b>D</b>	26,57 ± 0,22 <sup>c</sup>	341,94 ± 19,00 <sup>b</sup>	5,49 ± 0,31 <sup>d</sup>	99,61 ± 0,64 <sup>c</sup>
<b>E</b>	36,43 ± 1,44 <sup>d</sup>	579,51 ± 13,00 <sup>d,e</sup>	7,92 ± 0,28 <sup>e</sup>	233,78 ± 2,12 <sup>e</sup>
<b>F</b>	59,08 ± 1,49 <sup>h</sup>	666,60 ± 28,00 <sup>f</sup>	18,57 ± 0,37 <sup>h</sup>	624,48 ± 1,49 <sup>i</sup>
<b>G</b>	41,83 ± 1,04 <sup>e</sup>	492,32 ± 51,00 <sup>c</sup>	5,75 ± 0,31 <sup>d</sup>	270,03 ± 1,51 <sup>f</sup>
<b>H</b>	98,04 ± 1,10 <sup>i</sup>	506,42 ± 42,00 <sup>c,d</sup>	17,37 ± 1,06 <sup>g</sup>	395,88 ± 4,15 <sup>g</sup>
<b>I</b>	24,50 ± 0,51 <sup>c</sup>	280,33 ± 0,20 <sup>a,b</sup>	5,69 ± 0,48 <sup>d</sup>	170,03 ± 2,81 <sup>d</sup>
<b>J</b>	14,69 ± 0,79 <sup>a</sup>	229,22 ± 9,80 <sup>a</sup>	3,72 ± 0,05 <sup>a,b</sup>	103,63 ± 2,49 <sup>c</sup>
<b>K</b>	47,80 ± 1,34 <sup>f</sup>	648,65 ± 41,00 <sup>e,f</sup>	10,05 ± 0,31 <sup>f</sup>	108,61 ± 1,53 <sup>c</sup>
<b>L</b>	54,01 ± 0,90 <sup>g</sup>	536,09 ± 45,00 <sup>c,d</sup>	17,71 ± 0,06 <sup>g,h</sup>	586,43 ± 1,06 <sup>h</sup>
<b>M</b>	17,13 ± 0,55 <sup>a,b</sup>	199,16 ± 17,00 <sup>a</sup>	5,08 ± 0,43 <sup>c,d</sup>	176,51 ± 1,88 <sup>d</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05).

EAG – equivalentes a ácido gálico; EAA – equivalentes a ácido ascórbico.

Letras de A-M: espécies de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1.

Fonte: próprio autor

O teor de compostos fenólicos totais encontrados nas amostras variou entre 14,69 - 98,04 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> de mel. A amostra da espécie H apresentou o maior valor, enquanto a amostra da espécie J apresentou o menor valor, ambas as amostras pertenciam ao mesmo local de coleta. A concentração e o tipo de compostos fenólicos presentes são influenciados majoritariamente pela origem floral do néctar, e esta classe de substâncias parecem ser a principal contribuinte para as atividades bioativas do mel (ANKLAM, 1998; KÜÇÜK et al., 2007; SILICI, SAGDIC, EKICI, 2010; STANISLAVA et al., 2013). Os resultados encontrados são semelhantes aos encontrados em estudos com méis de *Apis mellifera*, onde os valores variam entre 4,21 e 109,19 mg EAG 100g<sup>-1</sup>, dependendo da região ou país de produção (SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010; STANISLAVA et al., 2013).

Considerando a falta de um método oficial para a determinação da atividade antioxidante em amostras de méis, no presente estudo a atividade antioxidante foi avaliada por três diferentes métodos para que se tivesse confiabilidade nas análises: ORAC, DPPH e FRAP. É possível ainda ressaltar que na literatura são escassos os trabalhos que relatam a quantificação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão, porém, para méis de abelha *Apis mellifera* há inúmeras publicações, as quais tornam possível correlacionar com o presente estudo.

O ensaio ORAC avalia a atividade antioxidante, inibindo a oxidação induzida por radicais peroxil por transferência de átomos de hidrogênio (H<sup>+</sup>) (HOGAN et al., 2002; HOGAN et al., 2009). Os resultados obtidos para o ensaio de ORAC nas amostras de méis de abelhas sem ferrão analisados, variaram entre 199,16 e 666,60 µmol TE 100 g<sup>-1</sup>. Entre os méis analisados, *Melipona Marginata* (F) apresentou a maior capacidade antioxidante, seguido por *Scaptotrigona bipunctata* (K), ambos coletados no município de SMO, e os menores valores ficaram com as amostras da espécie *Melipona quadrifasciata* (A) e *Scaptotrigona Bipunctata* (M) dos municípios de FLN e SMO respectivamente. Os valores encontrados para o teste de ORAC em méis de abelhas sem ferrão, apresentaram semelhança aos méis de *Apis mellifera* provenientes de outros países, que apontam valores de 212,00 a 2107,00 µmol TE 100 g<sup>-1</sup> BERETTA et al., 2005; BRUDZYNSKI; ABUBAKER; MIOTTO, 2012; GORJANOVIĆ et al., 2013).

Para as análises de DPPH realizadas em amostras de mel de abelhas sem ferrão, o valor mínimo apresentado foi de 3,23 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> para o mel de *Melipona quadrifasciata* (A) proveniente do



município de SMO e máximos de 18,57 mg EAA 100g<sup>-1</sup> para o mel de *Melipona Marginata* (F) proveniente do município de FLN. Silva et al. (2013) também apresentam resultados para análises de DPPH em méis de abelhas sem ferrão, apontando valores de 10,6 - 12,9 mg EAA 100g<sup>-1</sup> necessários para reduzir 50% do radical em méis de *Melipona subnitida*, produzidos no estado da Paraíba. Tais valores são semelhantes aos encontrados para o mel de abelha *Apis mellifera*, que apontam valores da ordem de 2,0 a 307,00 mg EAA 100 g<sup>-1</sup>, sempre dependendo da origem geográfica e floral do néctar coletado para a produção do mel (KOWALSKI, 2013; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010; TORNUK et al., 2013).

Os valores médios das análises de FRAP para o mel de abelhas sem ferrão indicam diferenças estatísticas significativas para todas as amostras, com valores de 64 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup> para mel de abelha *Melipona bicolor* (amostra A do município FLN) e 624,48 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup> para mel de *Melipona marginata* (amostra F do município SMO) o qual apresentou o maior poder de redução do Fe<sup>3+</sup>. Para o mel de *Apis mellifera* os valores relatados variam entre 10,65 e 196,70 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup>, apresentando divergências de acordo com a origem floral (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; BLASA et al., 2007; GORJANOVIĆ et al., 2013).

É possível observar valores similares de fenólicos totais e atividade antioxidante para mel de abelhas sem ferrão, quando comparados aos valores descritos na literatura para méis de abelhas *Apis mellifera*. É possível também visualizar, que o maior valor de compostos fenólicos totais foi encontrado na amostra H (*Tetragonisca angustula angustula*) do município de SMO e os maiores valores de atividade antioxidante (DPPH, FRAP, ORAC) foram encontrados na amostra F (*Melipona marginata*) também do município de SMO. De acordo com estudos, fatores sazonais, ambientais, processamento e principalmente, a fonte floral usada para coletar o néctar, podem interferir na composição e na atividade antioxidante do mel (BERTONCELJ et al., 2007; ESCUREDO et al., 2013; LACHMAN et al., 2010).

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos das treze amostras de méis de abelhas sem ferrão mostram evidentes diferenças quanto à composição de acordo como os parâmetros de identidade e qualidade, estabelecidos

pela legislação vigente que prioriza os méis de abelha *Apis mellifera*, demonstrando claramente a necessidade da elaboração de uma regulamentação específica para este tipo de produto. Quanto à presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, os resultados obtidos para o mel de abelhas sem ferrão mostram-se semelhantes aos relatados na literatura para mel de abelha *Apis mellifera*. O presente estudo pode servir como base de dados para auxiliar no possível desenvolvimento de uma nova normativa específica para o mel de abelhas sem ferrão, e contribuir para divulgar o mel de abelhas sem ferrão produzido no estado de Santa Catarina, como um produto de qualidade e com importantes propriedades antioxidantes, valorizando esse alimento natural frente à comunidade científica e a população em geral.

### **CAPÍTULO 3**

#### **DETERMINAÇÃO DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL E DO CONTEÚDO DE AÇÚCARES UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR EM MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO, ANTES E APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO**



## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e os açúcares (frutose, glicose e sacarose) em amostras de mel de abelhas sem ferrão, antes e após o tratamento térmico, aplicando um método de eletroforese capilar previamente descrito na literatura. Os métodos foram parcialmente validados quanto aos parâmetros de linearidade, efeitos de matriz, precisão e exatidão para a matriz de mel de abelhas sem ferrão. Um planejamento fatorial,  $2^2$ , com ponto central, foi proposto para determinar as melhores condições de tratamento térmico e, monitorado a formação de 5-HMF e a possível degradação de açúcares pós-procedimento. Nos estudos de alguns parâmetros de validação para as amostras de mel de abelhas sem ferrão, ambos os métodos mostraram-se lineares na faixa de concentração avaliada ( $R^2 > 0,995$  para 5-HMF e para açúcares  $R^2 > 0,999$ ) mostrando resultados satisfatório para precisão ( $CV \% \leq 6,20$  e  $8,98$  respectivamente) e exatidão ( $90,44$  a  $110,37\%$  para 5-HMF, enquanto que para os açúcares variaram de  $104,83$  a  $121,85\%$  para frutose,  $110,14$  a  $126,21\%$  para glicose e  $90,15$  a  $102,33\%$  para sacarose) e apresentaram ausência de efeito de matriz. Nenhuma das treze amostras *in natura* apresentou 5-HMF em níveis superiores ao limite de detecção. As condições extremas dos testes de tratamento térmico aplicado os méis de abelha sem ferrão foram comparados ao mel de *Apis mellifera* o qual apresentou maiores teores de 5-HMF, com valores da ordem de  $8,05 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $695,40 \text{ mg kg}^{-1}$  e para o mel de abelha sem ferrão os valores foram de  $< \text{LOQ}$  e  $238,18 \text{ mg kg}^{-1}$ . Os resultados sugerem que uma amostra de mel de abelhas sem ferrão submetido a um processo térmico controlado, pode ter sua vida de prateleira estendida, sem afetar o conteúdo de 5-HMF.

**Palavras-chave:** Meliponinae spp. 5-hidroximetilfurfural. Açúcares. Tratamento térmico. Planejamento fatorial.



## 1 INTRODUÇÃO

Durante séculos, as abelhas foram manejadas para a extração de mel, pólen, própolis e cera, esta atividade tornou-se rentável e sustentável em muitos países (NOGUEIRA-NETO, 1997). Comercialmente há duas áreas no manejo de abelha, a apicultura e a meliponicultura. A apicultura refere-se ao manejo racional, amplamente popular de abelhas *Apis mellifera*, enquanto a meliponicultura se refere ao manejo racional de abelhas sem ferrão, que tem experimentado recentemente um crescente interesse devido à ausência do ferrão nas abelhas e a peculiaridade dos seu produtos (OLIVEIRA et al., 2012).

No Brasil, várias espécies de abelhas nativas produzem mel e são conhecidas como abelhas indígenas, abelhas sem ferrão ou meliponíneos. Por algum tempo, esse mel não só foi consumido pela população local como um alimento e fonte de energia, mas também cultivado por suas propriedades medicinais (GUERRINI et al., 2009; SILVA et al., 2013). Grande parte da produção de mel no Brasil ocorre nas regiões Nordeste e Norte, embora a produção tenha aumentado recentemente no Sudeste (São Paulo) e em regiões de climas tropicais e subtropicais como a região Sul (Paraná e Santa Catarina).

Os méis de abelhas sem ferrão têm sido valorizados pela população brasileira, devido às suas propriedades medicinais citadas em algumas literaturas e descritas pela cultura popular. Para Silva et al. (2013), o crescente interesse pelo mel produzido por abelhas sem ferrão deriva da medicina popular e de sua famosa composição, anti-séptica, antimicrobiana, anti-inflamatória. Além disso, o mel de abelhas sem ferrão tem suas próprias características, como sabor e aroma diferenciados, cristalização mais lenta e textura mais fluida (ALVES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012). A fluidez do mel de abelhas sem ferrão deriva de seu alto teor de água, o qual pode ser responsável pela ocorrência de fermentação indesejável, causada por leveduras pertencentes à microbiota do próprio néctar ou introduzida pelos manipuladores do apiário. Esta fermentação resulta na formação de compostos orgânicos que podem afetar sabor e cor, assim como a diminuição da vida de prateleira (ABRAMOVIC et al., 2008).

Destacando as vantagens e qualidades o mel de abelhas sem ferrão, vem apresentando claramente um aumento dos volumes de produção, aflorando a necessidade de se estender a vida de prateleira do produto, sem alterar suas propriedades nutricionais e medicinais, visando um sistema possível de ser aplicado em pequenas propriedades rurais. Para isso, algumas técnicas já estão sendo estudadas e aplicadas,

como a desidratação, o tratamento térmico e refrigeração (KOWALSKI, 2013; SODRÉ et al., 2008; TOSI et al., 2002; TURHAN et al., 2008), entre os quais o tratamento térmico tem se mostrado simples e eficaz.

Segundo Tosi et al. (2002) e Turhan et al. (2008) o tratamento térmico do mel, pode apresentar como um método prático para a prevenção ou atraso da cristalização, destruição de micro-organismos ou ainda como facilitador no envase por redução da viscosidade (TOSI et al., 2002; TURHAN et al., 2008). No entanto, pode favorecer negativamente às características do mel, considerando que o tratamento térmico pode levar a formação do 5-HMF (TURHAN et al., 2008).

O 5-HMF é um composto furânico que pode ser formado na reação de Maillard ou pela desidratação de hexoses em meio ácido (TOSI et al., 2002), ou ainda em temperaturas baixas em longos períodos de armazenamento, produzindo concentrações mais baixas, uma vez que a reação de Maillard diminui nestas condições. Além da temperatura, a formação de 5-HMF depende do tipo de açúcar, pH, atividade de água e da concentração de cátions divalentes presentes no meio. Estudos *in vitro* indicam que o 5-HMF em altas concentrações pode ser citotóxico, mutagênico, carcinogênico e genotóxico (CAPUANO; FOGLIANO, 2011), considerando esta toxicidade é importante monitorar suas concentrações em produtos alimentares como o mel (TOSI et al., 2002).

O objetivo deste capítulo foi avaliar o teor de 5-HMF e açúcares em mel de abelhas sem ferrão coletadas no Estado de Santa Catarina. O trabalho incluiu o monitoramento inicial dos compostos presentes no mel *in natura* e após tratamento térmico, proposto por meio de planejamento fatorial considerando apenas uma amostra e comparado aos méis de abelhas *Apis mellifera*. Os teores dos compostos da matriz de mel de abelhas sem ferrão foram determinados através de um método já existente na literatura utilizando a técnica de eletroforese capilar (CE), o qual foi avaliado alguns parâmetros de validação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, os solventes de pureza cromatográfica, e a água purificada por desionização (sistema Milli - Q, Millipore, Bedford, MA, EUA). O 5-HMF, cafeína, tetraborato de sódio (TBS), metanol, dodecilsulfato de sódio, ácido sórbico e brometo de cetiltrimetilamônio foram obtidos



junto a Sigma - Aldrich (Santa Ana, CA, E.U.A). Hidróxido de sódio, mono-hidrato de D-(+)- glicose, D – frutose e sacarose foram obtidas junto a Merck (RJ, RJ, Brasil).

As soluções padrões foram preparadas diariamente, armazenadas a 4 °C, e diluídas com água desionizada para se obterem as concentrações necessárias. Na análise de 5 – HMF, o eletrólito de corrida foi composto de 5 mmol L<sup>-1</sup> de TBS e 120 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, com pH final igual de 9,3 e armazenado à temperatura ambiente até o momento da análises, de acordo com Rizelio et al. (2012a). Na análise dos açúcares, o eletrólito de corrida foi composto por 20 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido sórbico, 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de CTAB e 40 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH, pH final igual a 12,2, também descrita por Rizelio et al. (2012b).

## 2.2 Preparo de amostra

Para a análise de 5-HMF, as amostras foram preparadas seguindo o método proposto por Rizelio et al. (2012a), com algumas modificações, conforme segue: massas de amostras de mel *in natura* e tratadas termicamente foram pesadas (0,5 g), dissolvidas em 0,5 g de água desionizada e dispostas nos *vials* de injeção do equipamento de EC. A cafeína foi utilizada como padrão interno (PI) em uma concentração final de 200 mg L<sup>-1</sup>. Para as análises de açúcares as amostras de mel foram preparadas de acordo com Rizelio et al. (2012b), onde massas de cerca de 2,5 g das amostras foram dissolvidas em água desionizada em um balão volumétrico de 50 mL, o volume foi devidamente aferido, e a solução de amostra de mel foram diluída na proporção 1:10 (v/v) em água desionizada. Ambas as soluções foram filtradas através de filtros de membrana de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA, E.U.A) e injetadas diretamente no equipamento para a análise de CE.

## 2.3 Instrumentação

No presente trabalho foram utilizados os modos de eletroforese capilar de zona (CZE) e de cromatografia eletrocínética micelar capilar (MEKC), em sistema de eletroforese capilar (modelo 7100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e um dispositivo de controle de temperatura, a qual foi mantida a 25 °C. Aquisição e software de tratamento de dados foram fornecidos pelo fabricante (HP ChemStation®). No início de cada dia, o capilar foi condicionado por lavagem com 1 molL<sup>-1</sup>

NaOH (10 min) seguido de lavagens de 10 minutos com água desionizada e solução eletrólito (15 min). Entre as corridas, o capilar foi recondicionado com a solução eletrólito (2 min). No final de cada dia de trabalho, o capilar foi lavado com NaOH a  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (5 min) e água (10 min). Em ambas as análises as soluções padrão e as amostras foram introduzidas na extremidade do capilar mais próximo ao detector e injetado hidrodinamicamente a 50 mbar durante 3 s com pressão negativa (RIZELIO et al., 2012a,b).

A determinação de 5-HMF foi realizada em um capilar de sílica fundida e revestida de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), de 32,0 cm de comprimento total (8,5 cm de comprimento efetivo  $\times$  50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno  $\times$  375  $\mu\text{m}$  diâmetro externo). A voltagem aplicada à separação foi de 30 kV com polaridade positiva na extremidade da injeção, e a aquisição dos dados no comprimento de onda de 284 nm (RIZELIO et al., 2012a ).

As análises dos açúcares foram realizadas em um capilar de sílica fundida de 60,0 cm de comprimento total (8,5 cm de comprimento efetivo  $\times$  50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno  $\times$  375  $\mu\text{m}$  diâmetro externo). A voltagem aplicada para a separação foi de 25 kV com polaridade negativa na extremidade da injeção e o detector ajustado para o comprimento de onda de 254 nm (detecção indireta com uma referência a 360 nm para o pico de inversão) (RIZELIO et al., 2012b), os resultados de concentração de açúcares foram expressos em % (m/m).

## 2.4 Delineamento experimental para a aplicação do tratamento térmico

Para identificar as variáveis que afetam a formação de 5- HMF durante o tratamento térmico, estudos preliminares foram realizadas e a literatura foi consultada (KOWALSKI, 2013; TOSI et al., 2002; TURHAN et al., 2008). Depois de avaliar a variáveis, um modelo experimental foi construído com um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central para determinar as melhores condições de tratamento térmico. O modelo experimental está exposto na Tabela 3.1. A resposta do planejamento fatorial completo foi avaliada para a formação de 5- HMF e o conteúdo de açúcares.

Tabela 3.1- Os valores reais das variáveis independentes e seus níveis codificados do modelo experimental aplicado ao processo de tratamento térmico em amostras de mel de abelhas sem ferrão.

Variáveis	Níveis codificados		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	75	85	95
Tempo (min)	20	40	60

Fonte: próprio autor

Para aplicar o tratamento térmico, foi escolhida 1 amostra de mel de abelhas sem ferrão com o maior conteúdo de açúcares. A amostra foi aquecida em banho de água quente de acordo com as condições estabelecidas pelo modelo experimental. Um termômetro foi inserido no centro da amostra, para controlar a temperatura, e depois que a amostra atingiu o tempo e a temperatura adequados, a amostra foi restabelecida à temperatura ambiente com um banho de gelo.

Para comparar os dados de mel de abelhas sem ferrão com o mel de abelha *Apis mellifera*, outras duas condições extremas foram testadas para avaliar a formação de 5-HMF em *Apis mellifera*. Na primeira condição, ambas as amostras de mel foram aquecidas num banho de água a 75 °C durante 15 min, e, na segunda condição, a 75 °C durante 24 horas na estufa. Após o tratamento térmico, as amostras foram submetidas à análise de 5- HMF por EC.

## 2.5 Procedimento de avaliação de alguns parâmetros de validação de métodos análises de mel de abelhas sem ferrão

Uma vez que o método de Rizelio et al. (2012a, b) foi validado para amostras de mel de *Apis mellifera*, seus parâmetros de linearidade, efeitos de matriz, precisão e exatidão foram investigadas para o mel de abelhas sem ferrão. A adequação do método ao seu propósito foi feita a partir dos resultados obtidos para as características de desempenho estabelecidas por protocolos de validação (BRASIL, 2011; COMUNIDADE EUROPEIA, 2002; EURACHEM, 1998; THOMPSON, ELLISON; WOOD, 2002).

### 2.5.1 Linearidade e efeito de matriz

A linearidade foi avaliada em curvas aquosa e curvas em matriz, devido à indisponibilidade de amostras brancas ( amostras com

ausência dos compostos de estudos). Cinco níveis de concentrações foram preparadas na faixa de 10 a 80 mg L<sup>-1</sup> de padrão 5 - HMF. Para as curvas de carboidratos, como para a frutose e glicose os níveis que variaram de 180 - 3600 mg L<sup>-1</sup> e para a sacarose que variou de 342 - 5130 mg L<sup>-1</sup>, cada um com incrementos equidistantes. Curvas de calibração em matriz foram obtidas pelo método de adição de padrão, nas mesmas concentrações anteriormente relatadas. Estas curvas foram preparadas em 3 dias diferentes para obter repetições independentes. O efeito de matriz foi avaliado comparando os coeficientes angulares obtidos para cada uma das soluções padrão e com um teste t de *student* de curvas de calibração da matriz com um nível de confiança de 95% (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### 2.5.2 Precisão e exatidão

Para avaliar a precisão intra-ensaio de 5-HMF e açúcares foi determinada por três repetições independentes de cada um dos padrões utilizados para obter as curvas de calibração (em cinco níveis de concentração). A precisão intermediária foi avaliada através da análise de três preparações de soluções padrão ao longo de um período de 3 dias, com seis injeções consecutivas de cada nível de concentração. Os resultados de precisão foram expressos em termos dos coeficientes de variação (CV) para as réplicas de soluções padrão em cada nível de concentração.

A exatidão foi avaliada em termos da porcentagem de recuperação, determinada pelo método de adição de padrão, em três níveis para cada açúcar ou 5 - HMF, sendo cada nível avaliado em triplicata.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

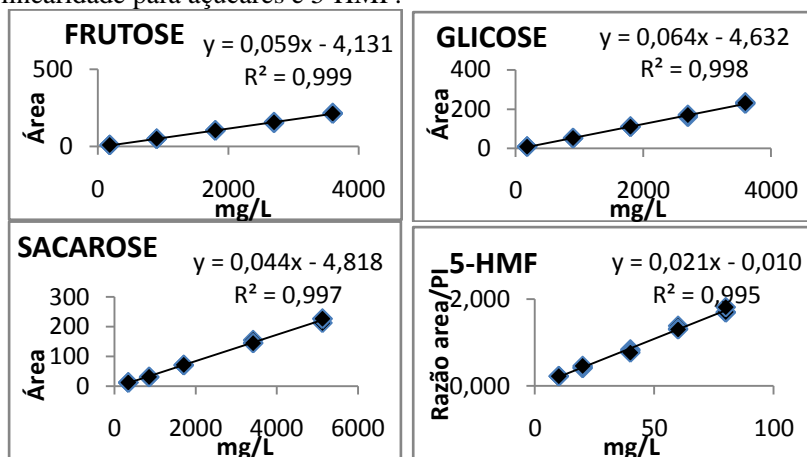
### 3.1 Avaliação de alguns parâmetros de validação do método utilizados para o mel de abelhas sem ferrão

#### 3.1.1 Linearidade e efeito matriz

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA (BRASIL, 2011), a linearidade consiste na produção de resultados analíticos, diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, respeitando o intervalo estabelecido. Com as

concentrações das soluções padrão utilizadas e os valores das áreas dos picos (carboidratos) e a razão da área do 5-HMF/PI, foi possível construir uma curva com 5 níveis. A qualidade da curva de calibração, bem como a sua linearidade, foi avaliada a partir da inspeção visual do gráfico de resíduos da curva e através da regressão linear, consideraram-se somente os pontos ao redor da linha de tendência. De acordo com a Figura 3.1, é possível observar que os coeficientes de determinação obtidos para cada um dos analitos foram satisfatórios ( $R^2 > 0,99$ ).

Figura 3.1 Curvas de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade para açúcares e 5-HMF.



Fonte: próprio autor

O estudo do efeito de matriz é realizado com o objetivo de verificar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral. Para avaliar o efeito de matriz são realizados os preparos de curvas de calibração simples em solventes apropriados e com a adição do analito em amostras brancas ou através da adição de concentrações de padrão conhecidas na própria matriz (INMETRO, 2003; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Na tabela 3.2 é possível observar os resultados para efeito de matriz e alguns parâmetros utilizados para a realização das análises.

Tabela 3.2- Desempenho analítico dos métodos propostos por eletroforese capilar para o parâmetro de efeito de matriz e os limites de quantificação e determinação.

<b>Parâmetros</b>	<b>n</b>	<b>5-HMF</b>	<b>Frutose</b>	<b>Glicose</b>	<b>Sacarose</b>
<i>Solvente<sup>b</sup></i>					
<i>T</i>	6	5,42	0,7809	1,0112	0,633
<i>P</i>		0,116	0,516	0,496	0,591

<sup>b</sup> Avaliação homocedasticidade residual pelo teste *t* para as curvas de calibração de solventes e pareados por matriz (*t* críticos: 12,70 para HMF e 4,30 para carboidratos).

*n*: número de observações, *t*: teste- *t*, *p*: significância.

Fonte: próprio autor

Com os resultados obtidos fez-se a comparação das inclinações das curvas de solução padrão aquoso e curva de matriz, através da aplicação teste *F* (Ficher - Snedecor) que define qual teste *t* utilizar. Portanto, se o *F* calculado for menor que o *F* tabelado, não há diferença significativa entre as variâncias, e neste caso, a matriz não afeta a precisão do método na faixa de trabalho avaliada. Sendo assim, recomenda-se aplicar o teste *t* para variâncias equivalentes, e se o *t* calculado for menor que o *t* tabelado, confirma-se que não há efeito de matriz. Em outro caso se o teste *F* apresentar diferença significativa (*F* calculado maior que *F* tabelado) deve-se aplicar o teste *t* para variâncias distintas, e assim, se *t* calculado for menor que *t* tabelado, não há efeito de matriz (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

Os dados obtidos para o estudo do efeito de matriz foram avaliados e não houve diferença significativa entre as inclinações das curvas ( $p > 0,05$ ), ou seja, *t* calculado (12,70 para HMF e 4,30 para carboidratos) foi maior que *t* tabelado (5,42 para o 5-HMF, 0,78 frutose, 1,01 glicose e 0,63 sacarose). Portanto, tais resultados indicam que não há efeito de matriz na faixa de concentração estudada para frutose, glicose, sacarose e 5-HMF em ambas as curvas, sendo possível inferir que a curva aquosa forneceu as mesmas respostas que a curva em matriz. Os resultados podem ser avaliados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3- Desempenho analítico dos métodos propostos por eletroforese capilar para o parâmetro de linearidade.

<b>Parâmetros</b>	<b><i>n</i></b>	<b>5-HMF</b>	<b>Frutose</b>	<b>Glicose</b>	<b>Sacarose</b>
Linearidade - intervalo linear (mg L <sup>-1</sup> )		10 - 80	180 - 3600		342 - 5130
Linearidade – inclinação		0, 0229	0, 0598	0, 0646	0, 0443
Linearidade – Intercepção		- 0, 0925	- 4, 1315	- 4, 6321	- 4, 8186
Linearidade - coeficiente de regressão, R <sup>2</sup>		0, 995	0, 999	0, 998	0, 997
<i>F</i> <sup>a</sup>	15	2337	10197	6943	5097
LOQ (mg L <sup>-1</sup> )*		0,31	0, 088	0, 097	0, 074
LOD (mg L <sup>-1</sup> )*		0,09	0026	0, 026	0, 022

<sup>a</sup> F crítico: 1,13

*n*: número de observações, t: teste- t, p: significância.

\*Rizelio et al. (2012 a,b.).

Fonte: próprio autor

### 3.1.2 Precisão e exatidão

A precisão intra-ensaio foi determinada por injeções consecutivas realizadas de forma aleatória em cada nível das curvas de calibração para 5-HMF e carboidratos. Cada ponto (cada um dos cinco níveis) foi preparado com três repetições de solução padrão independente. Para 5-HMF, a repetitividade (a precisão intra-ensaio) para o tempo e a área de migração corrigida (CV %) foi de 1,21 e 6,15 %, respectivamente. Os valores de CV encontrados para os açúcares para tempo de migração foram menores que 8,98% e para a área, menores que 8,08 %. Os resultados de CV para a precisão intermediária (isto é, a precisão inter-ensaio) durante 3 dias consecutivos, foram também obtidos por meio de três repetições de soluções padrão independentes. Para o tempo de migração e para a área, os valores foram de 0,79 % e menores que 5,44 % para o 5-HMF, bem como 3,44 % para o tempo de migração e de 6,22 % para a área dos carboidratos. Todos os valores de CV calculados apresentaram-se abaixo de 10%, para

amostras de mel de abelhas sem ferrão, indicando uma precisão aceitável para o método, resultados considerados de acordo como o critério estipulado pelo MAPA de 15% (BRASIL, 2011).

Tabela 3.4- Desempenho analítico dos métodos propostos por eletroforese capilar para o parâmetro de precisão.

<b>Parâmetros</b>	<b>n</b>	<b>5-HMF</b>	<b>Frutose</b>	<b>Glicose</b>	<b>Sacarose</b>
Precisão intra-ensaio - área do pico (CV,%)	3	6,15	7,81	8,08	6,81
Precisão intra-ensaio - tempo migração (CV,%)	3	1,21	7,26	7,63	8,98
Precisão inter-ensaio- área do pico (CV,%)	9	0,79	6,22	3,52	3,86
Precisão inter-ensaio- tempo migração (CV,%)	9	5,44	2,79	2,89	3,44

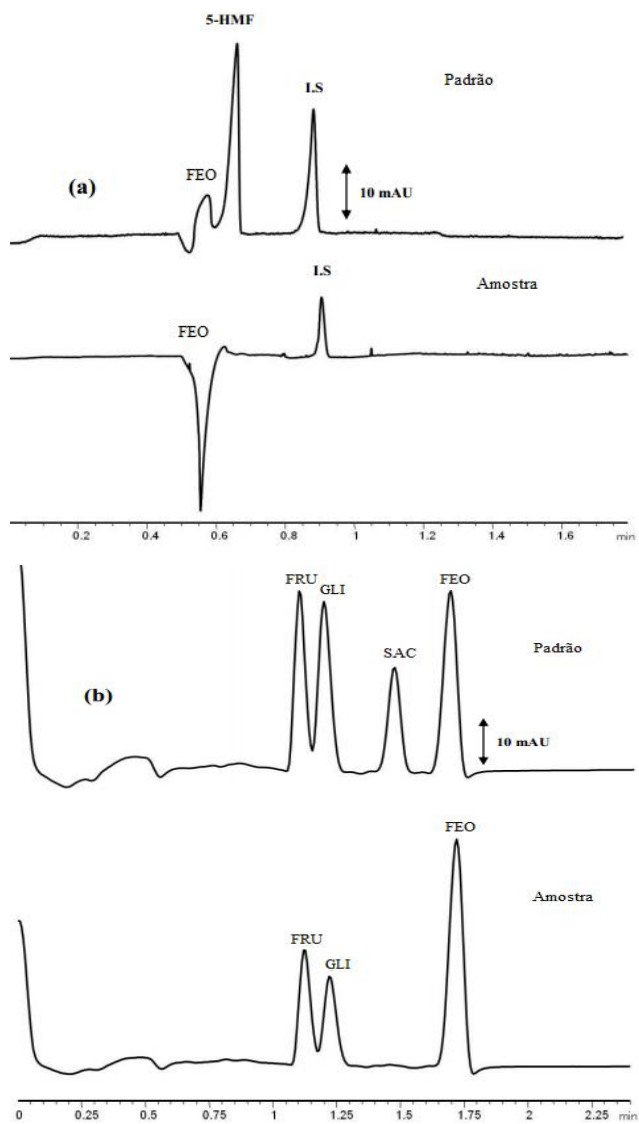
n: número de observações

Fonte: próprio autor

A exatidão para 5-HMF varia 90,44-110,37%, enquanto que para carboidratos variaram 104,83-121,85% para frutose, 110,14-126,21% para glicose e 90,15-102,33% para sacarose. Os resultados dos parâmetros de validação indicam a viabilidade do método para determinar 5-HMF e carboidratos em amostras de mel de abelhas sem ferrão segundo método de validação proposto pelo MAPA (BRASIL, 2011). Para amostras de mel *Apis mellifera*, Rizelio et al. (2012a, b) obteve exatidão variando 96,37 - 99,56% para 5-HMF e 96,20-109,2%, com valores semelhantes aos obtidos no presente estudo. Na Figura 3.2 estão expostos os eletroferogramas obtidos para as leituras dos padrões de 5-HMF e açúcares (frutose, glicose, sacarose) e das amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.).



Figura 3.2- Eletroferogramas obtidos para as separações dos padrões de 5-HMF e açúcares (frutose, glicose, sacarose) e das amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.).



Fonte: próprio autor.

### 3.2 Efeitos do tratamento térmico sobre 5- HMF e açúcares do mel de abelhas sem ferrão

Para efetuar o tratamento térmico, a amostra E (69,36%, m/m de F+G) foi escolhida, por apresentar o maior teor de açúcares, e consequentemente, o menor conteúdo de umidade. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.5, onde, em todas as condições testadas em relação o planejamento fatorial, o conteúdo de 5-HMF estava abaixo do LOQ. O tratamento térmico não afetou significativamente o teor de açúcares na amostra de mel de abelhas sem ferrão. O tratamento térmico foi realizado em duas condições extremas a fim de comparar a formação de 5-HMF em amostras de mel de abelha *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão.

Tabela 3.5- Modelo experimental após o tratamento térmico para mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.).

Corridas	Tempo (X <sub>1</sub> ) mim	Temperatura (X <sub>2</sub> ) °C	Frutose e Glicose (% m/m)	5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> )
1	20 (-1)	75 (-1)	65,25 ± 0.70	< LOQ
2	60 (+1)	75 (-1)	68,38 ± 0.79	< LOQ
3	20 (-1)	95 (+1)	66,00 ± 0.85	< LOQ
4	60 (+1)	95 (+1)	61,80 ± 2.35	< LOQ
5	40 (0)	85 (0)	66,47 ± 1.61	< LOQ
6	40 (0)	85 (0)	59,80 ± 0.32	< LOQ
7	40 (0)	85 (0)	71,72 ± 0.73	< LOQ

Fonte: próprio autor

Observando essa resistência do mel de abelhas sem ferrão à formação de 5-HMF, os méis foram então, expostos a um tratamento térmico extremo e comparados aos méis de *Apis mellifera*. Na Tabela 3.6 estão expostos os resultados obtidos para as amostras de mel de abelha sem ferrão e abelha *Apis mellifera* submetidos a tratamento térmico extremo.

Tabela 3.6- Açúcares redutores (frutose e glicose) e 5-HMF em amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) e *Apis mellifera*, antes e após o tratamento térmico extremo.

Amostra de mel	5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Frutose e glicose (% m/m)
Abelhas sem ferrão <i>in natura</i>	< LOQ	69,36 ± 0,17
Abelhas sem ferrão 15 min /75°C	< LOQ	61,86 ± 1,24
Abelhas sem ferrão 24 horas/ 75°C	238,18 ± 8,75	58,31 ± 0,70
<i>Apis mellifera in natura</i>	< LOQ	70,35 ± 1,13
<i>Apis mellifera</i> 15 min/75°C	8,05 ± 1,30	68,64 ± 2,18
<i>Apis mellifera</i> 24 horas/ 75°C	695,40 ± 26,49	67,41 ± 7,41

Fonte: próprio autor

Quando submetidos a temperaturas de 75 °C durante 15 min, o mel de *Apis mellifera* formou 8,05 mg kg<sup>-1</sup> de 5-HMF, enquanto o mel de abelhas sem ferrão ficou abaixo do LOQ. Quando a amostra foi submetida a temperaturas de 75 °C por 24 h, o conteúdo de 5-HMF de *Apis mellifera* foi 695,40 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto o mel de abelhas sem ferrão foi apenas 238,18 mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 3.6). Estes resultados sugerem uma possível resistência à formação de HMF em mel de abelhas sem ferrão, que pode ser justificado pelos seus tipos de açúcares que o compõem, onde o conteúdo de frutose predomina. Podendo conter concentrações mais elevadas de glicose, o mel de abelha *Apis mellifera* está mais suscetível a velocidade da reação de Maillard, resultando em valores mais elevados quanto à formação de 5-HMF.

A literatura, especializada destaca outros fatores que podem influenciar na formação de 5-HMF, como a atividade de água (Aw) e acidez, quando a Aw é alta, a reação de Maillard é retardada e a formação de 5-HMF diminui (FENNEMA, 2010; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). Quando a acidez é elevada, a velocidade da reação de Maillard diminui, e a formação de 5-HMF é inibida. Os estudos indicaram que o mel de abelhas sem ferrão tem maior Aw e acidez em comparação aos méis de *Apis mellifera*s, o que pode justifica o teor de 5-HMF reduzido no mel de abelhas sem ferrão (GUERRINI et al., 2009;

SILVA et al., 2013). Na Tabela 3.6 estão expostos os valores de 5-HMF e açúcares submetidos ao tratamento térmico extremo, sendo possível observar a formação de 5-HMF e a diminuição dos açúcares em relação ao tempo e temperatura.

Outros estudos investigaram a formação de 5-HMF, após o tratamento térmico em *Apis mellifera*. Kowalski (2013) avaliou o efeito do tratamento térmico sobre a formação de 5-HMF em méis de *Apis mellifera*, alcançando valores de  $94,33 \text{ mg kg}^{-1}$  de 5-HMF, após um tratamento térmico de  $90^{\circ}\text{C}$  durante 60 min. Turhan et al. (2008) avaliando a qualidade de amostras de mel *Apis mellifera*, quantificaram 5-HMF por CLAE, como uma consequência do tratamento térmico, observando o valor máximo de  $73,78 \pm 1,01 \text{ mg kg}^{-1}$ , a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 90 min.

#### 4 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível determinar o conteúdo de 5-HMF e açúcares em méis de abelhas sem ferrão através dos métodos propostos por Rizelio et al. (2012a, b). O presente trabalho relata resultados satisfatórios para linearidade, efeito de matriz e precisão. Entretanto, para o parâmetro de exatidão os valores excedem a faixa de aceitação exigida pelo MAPA. Estes métodos se mostraram simples, rápidos e de baixo custo operacional, sugerindo sua aplicação na análise de rotina de méis de abelhas sem ferrão. Foi observado que o mel de abelhas sem ferrão apresentou maior resistência à formação de 5-HMF em relação ao mel de abelha *Apis mellifera*, podendo ser atribuído ao tipo de açúcar, níveis de umidade, Aw e acidez, podendo ser o tratamento térmico um processo eficaz para prorrogar a vida de prateleira de méis de abelhas sem ferrão, sem afetar o conteúdo de 5-HMF e consequentemente de açúcares redutores.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos das amostras de méis de abelhas sem ferrão mostram evidentes diferenças, quanto à composição, de acordo como os parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação vigente, que prioriza os méis de abelha *Apis mellifera*. Esses resultados reforçam a necessidade de padronização e implantação de um regulamento específico para este alimento diferenciado.

Os resultados obtidos para os teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, em méis de abelhas sem ferrão, mostraram-se semelhantes aos descritos na literatura para o mel de abelha *Apis mellifera*. Embora não haja evidências para afirmar que o mel é um alimento de importância primária na dieta humana, seu consumo pode ser indicado para complementar a dieta como fonte de compostos fenólicos e com propriedades antioxidantes.

A partir das técnicas desenvolvidas por Rizelio et al. (2012a,b), utilizando eletroforese capilar, foi possível avaliar alguns parâmetros de validação e quantificar 5- HMF e açúcares (frutose, glicose e sacarose), na matriz de mel de abelha sem ferrão. De forma geral, os resultados obtidos apresentaram-se satisfatórios.

E por fim, os testes efetuados aplicando tratamento térmico em amostra de mel de abelhas sem ferrão, apresentaram maior resistência à formação de 5-HMF em relação ao mel de abelha *Apis mellifera*, sugerindo como um provável processo para prorrogar a vida de prateleira de méis de abelhas sem ferrão, sem aumentar o conteúdo de 5-HMF.

Os resultados desse trabalho servem como base de dados para auxiliar no possível desenvolvimento de uma nova normativa específica para o mel de abelha sem ferrão e contribui para divulgá-lo como um alimento de excelente qualidade e com importantes propriedades funcionais, valorizando esse alimento natural frente à comunidade científica e a população em geral.

Como perspectivas de trabalho verificam-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o mel de abelhas sem ferrão, como o estudo do perfil e o conteúdo de compostos fenólicos majoritários, o teor de macro e micro elementos minerais, o conteúdo de aminoácidos livres.

Avaliação da bioacessibilidade destes compostos, também se torna importante na tentativa de apresentar dados sólidos sobre as características químicas, qualidade nutricional e biológica do mel de abelhas sem ferrão e uma possível aplicação de um dos diferentes

métodos de beneficiamento e o acompanhamento da vida de prateleira analisando todos os parâmetros de identidade e qualidade.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMOVIČ, H.; JAMNIK, M.; BURKAN, L.; KAČM. Water activity and water content in Slovenian honeys. **Food Control**, v. 19, n. 11, p. 1086–1090, 2008.
- ABREU, B. et al. Determinação da umidade em méis não inspecionados comercializados no Estado do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 129, p. 88-90, 2005.
- ABREU, T. S. **Meliponário da serra**. Disponível em: <<http://meliponariodaserra.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 05 set. 2012.
- AINSWORTH, E.A.; GILLESPIE, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n.4. p.875–877, 2007.
- AJLOUNI, S.; SUJIRAPINYOKUL, P. Hydroxymehtylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1000-1005, 2009.
- AL, M. L. et al. Physico-chemical and bioactive porperties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 863-867, 2009.
- ALVES, E. M. et al. Estabilidade físico-química e sensorial de méis desumidificado de *Tetragoniscaangustula*. **Semana Entomológica da Bahia (SINSECTA)**, v. 24, p. 185-193, 2012.
- ALVES, R. M. de O. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Meliponamandacaia Smith* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 644-650, 2005.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M et al., Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48,ed. 8–9, p. 2490–2499, 2010.
- ANACLETO, D. A. et. al. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragoniscaangustulatreille*, 1811). **Revista Ciência e Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 535-541, 2009.

ANDRADE, P. et al. Determination of phenolic compounds in honey with different floral origin by capillary zone electrophoresis.

**Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 1997.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANKLAM, E.A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. In: W. HORWITZ (Ed) (18.ed.). Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists, Inc., 2005.

APAK, R. et al. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, Istanbul, v. 12, p. 1496-1547, 2007.

ARAUJO, D. R. D.; SILVA, R. H. D. D.; SOUSA, J. D. S. Avaliação da Qualidade físico-química do mel comercializado na cidade de Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.6, n.1, p. 51 – 55, 2006.

BAGHIANI, A. et al. Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of Ajugaiva L. Extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, v.1, n. 4, p. 21–30, 2011.

BALTRUŠAITYTĖ, V.; VENSKUTONIS, P. R.; ČEKŠTERYTĖ, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 502-514, 2007.

BARONI, M. V. et al. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 727-733, 2009.

BAYRAMOĞLU, G. et al. Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes:



Stability and catalytic properties of invertase. **Process Biochemistry**, v. 44, n.8, p. 880–885, 2009.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, , v. 45 n. 12, p. 4505-4515, 1997.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERETTA, G. et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorometric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, n. 2, p. 185-191, 2005.

BERKER, K. I. et al. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. **Talanta**, , v. 72, n. 3, p. 1157–116, 2007.

BERTONCELJ, J. et al. Characterization of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1661-1671, 2011a.

BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.

BERTONCELJ, J. et al. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 127, p. 296-302, 2011b.

BIJLSMA, L. et al. Water content of stingless bee honey (*Apidae, Meliponini*): Interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, p. 480 - 486, 2006.

BISBY, R. H.; BROOKE, R.; NAVARATNAM, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1002–1007, 2008.

BLASA, M. et al. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 217-222, 2006.

BLASA, M et al. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. **Food Chemistry**, v. 104, ed. 4, p. 1635–1640, 2007.

BOGDANOV, S. Honey quality and internacional regulatory standards: Review by the Internacional Honey Comission. **Bee World**, v. 90, p. 61-69, 1999.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMANN, C. **Harmonised methods of the international honey commission**. Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld, 2002.

BORA, K. et al. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante de diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksoniasellowiana*, (Presl.) Hook, DicksonIaceae. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, p.6-15, 2005.

BORSATO, D. M. **Composição química, caracterização e avaliação de atividade biologia de méis produzidos por meliponicultores do Paraná (Brasil)**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BRAND-WILLIAMNS, W.; CUVERLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 346, de 16 de agosto de 2004. **Disciplina a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários**. CONAMA, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola**. MAPA, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. MAPA, Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília, DF, 2011. 72 p.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta, Wien**, v.128, n.1/2, p.93-106, 1998.

BRUDZYNSKI, K.; ABUBAKER, K.; MIOTTO, D. Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. **Food Chemistry**, v. 133, ed.2, p.329–33, 2012.

CAMPOS, F. S.; GOIS, G.C.; CARNEIRO, G.G. Parâmetros físico-químicos do mel de abelhas *Meliponascutellaris* produzido no estado da Paraíba. **FAZU em Revista**, v. 7, p.186 - 190, 2010.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 303—311, 1993.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, ed.4), p.793–810, 2011.

CARVALHO, C. A. L. et al. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. Universidade Federal da Bahia. Cruz das Almas/SEAGRI-BA, 2005. 32 p. (Série meliponicultura n. 04).

CASETTARI, L. et al. ORAC of chitosan and its derivatives. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 243–24, 2012.

CHENG, X. et al. Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide

modified carbon paste electrode. **Food Chemistry**, v. 106, p. 830-835, 2008.

CICCO, N. et al. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, v.91, n.1, p. 107–110, 2009.

CODEX STAN 12.Codex AlimentariusComission.**Codex Standard for Honey**,v. 11, n. 12, rev. 2, p.1-8, 2001. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.net/web/more\\_info.jsp?id\\_sta=310](http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=310)> Acesso em: 20 nov. 2012.

COSTA, P. S. C.; OLIVEIRA, J. S. **Manual prático de criação de abelhas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2005. 424p.

COMUNIDADE EUROPEIA. Comissão das Comunidades Europeias. Conselho. Directiva 657, de 2002. Da execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Bruxelas, 17 ago. 2002. L221. p. 8-36.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S.; Determinação Simultânea de Ânions por Eletroforese Capilar: Características e Aplicações. **Química Nova**, v. 20, p. 512-518, 1997.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2.ed.São Paulo: Nobel, 1985.

CRANE, E.**Honey**: A Comprehensive Survey, International Bee Research Associ-ation, Heinemann, London, UK, 1975.

DUDONNÉ, S. et al.Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Le Sen, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 2009.

ESCUREDO, O. et al.Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 851–856, 2013.

ESCUREDO, O et al. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v. 149, p. 84–90. 2014.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. (1<sup>st</sup> ed.). Teddington, UK. (1998).

EVANGELISTA-RODRIGUES, A. et al. Análise físico-química de méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melípona Scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1166-1171, 2005.

FÉAS, X. et al. Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1255-1262, 2010.

FENNEMA, O. R. et al. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre : Artmed, 2010.

FERNANDES, E. et al. *In vitro* scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1895–1905, 2004.

FERREIRA, I. C. F.R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2, p. 32-39, 2007.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contribution of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1438-1443, 2009.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006, 602p;

FINOLA, M. S. et al. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1649–1653, 2007.

FONSECA, A. O. et al. **Qualidade do mel de abelhas sem ferrão: uma proposta para boas práticas de fabricação.** Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo, 2006. 70p. (Série meliponicultura n. 05).

GHELDOLF, N.; ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3050-3055, 2002.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (hymenoptera: apidae, meliponini). **Arquivo Instituto de Biociências**, v. 72, n. 4, p. 455-459, 2005.

GORJANOVIĆ, S. Ž et al. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, ed. 1, p. 13-18, 2013.

GUERRINI, A. et al. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, p. 1413-1420, 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HOGAN, S. et al. Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 438-443, dez. 2009.

HOLANDA, C. A.; OLIVEIRA; COSTA. Qualidade dos méis produzidos por *Meliponafasciculata* Smith da região do cerrado maranhense. **Química Nova**, v. 15, p. 1-4, 2012.

HUANG, D. et al. Development and validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1815-1821, 2002.

HUANG, D. et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4437–4444, 2002.

HUANG.D.; OU.B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1841-1856, 2005.

HUIDOBRO, J. F. et al. Diastase, invertase and  $\beta$ -glucosidase activities in fresh honey from northwest Spain. **Journal of Apicultural Research**, v. 34, p. 39–44, 1995.

IURLINA, M. O. et al. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1141-1149, 2009.

JIMIDAR, M. Electromigration methods: origins, principles and applications. In: AHUJA, S.; JESPERSEN, N. (ed.). **Comprehensive Analytical Chemistry**, 2006. v. 47, p. 572-623.

JOHNS, C.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Highly sensitive indirect photometric detection of cations by capillary electrophoresis with the cationic dye chrysoidine. **Journal of Chromatography A**, v. 997, p. 87-94, 2003.

KAMEYA, H. et al. Comparison of scavenging capacities of vegetables by ORAC and EPR. **Food Chemistry**, v. 145, p. 866–87, 2014.

KHALIL, M. I. et al. Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C921-C928, 2011.

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8, p. 2388–2392, 2010.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KOWALSKI, S. Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. **Food Chemistry**, v. 141, ed. 2, p.1378–138, 2013.

KÜÇÜK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different typed from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 526-534, 2007.

LACHMAN, J. et al. Evaluation of antioxidant activity and total phenolic of selected Czech honeys. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 52-58, 2010.

LÉON-RUIZ, V. et al. Vitamin C and sugar levels as simples markers for discriminating Spanish honey sources. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C356-C361, 2011.

LEWIS, S. W.; ANASTOS, N.; BARNETT, N. W. Capillary Electrophoresis for forensic drug analysis: a review. **Talanta**, v. 67, p. 269-279, 2005.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Porto, v. 613, n. 1, p.1-19, 2008.

MANARA, F.T. **Milionário abelhas de ouro**. Disponível em: <<http://abelhadeouro.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 18 set. 2013.

MERCOSUL/GMC/RES. N°. 89/99. (1999). Regulamento Técnico Mercosul. **Identidade e Qualidade do Mel**. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/GMC\\_RES\\_1999-089.pdf](http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/GMC_RES_1999-089.pdf)>. Acesso em: 23 jul. 2012.

MONTE, A. M. et al. Qualidade de méis de abelhas nativas sem ferrão do estado do piauí, Brasil. Revista. **Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, p.48-54, 2013.



NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 446 p.

OLIVEIRA, A. **Centro de produção técanoca- capacitação profissional a distancia/ curso de apicultura**. Disponível em: <<http://www.cpt.com.br/cursos-criacaodeabelhas/artigos/abelhas-anatomia>>. Acesso em: 18 set. 2013.

OLIVEIRA, E. N. A de.; SANTOS, D. da C. Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa. **Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 2, p.132-8, 2011.

OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Meliponafasciculata*, *M. flavolineata* (*Apidae*, *Meliponini*) e *Apismellifera* (*Apidae*, *Apini*) da Amazônia. **Química Nova**, Amazônia, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

ORAL, R. A. et al. New approaches to determination of HMF. **Food chemistry**, v.143, p. 367–370, 2014.

ORDOÑES et al., **Tecnologia em alimentos: Componentes dos alimentos e processos**. vol.1. Tradução Fátia Murad- Porto alegre: artmed, 2005, 294p.

OU, B. M.; HAMPSCH-WOODILL, R.L.; PRIOR. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Massachusetts, v. 49, p. 4619–4626, 2001.

OUCHEMOUKH, S.; LOUAILECHE, H.; SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. **Food Control**, v. 18, n. 1, p. 52-58, 2007.

PADARAUSKAS, A. Derivatization of inorganic ions in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2054-2063, 2003.

PEREIRA, R. P. et al. Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical Research**, Santa Marina, v.34, p. 973-983, 2009.

PERUQUETTI, R. C.; SILVA, Y. C.; DRUMOND, P. M.

**Forídeos Cleptoparasitas de Abelhas-sem-ferrão:** Sazonalidade, Distribuição Espacial e Atratividade de Iscas de Vinagre. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Rio Branco: EMBRAPA, 2012. 18p.

PIRES, R. M. C. **Qualidade do mel de abelhas**

*Apismellifera* Linnaeus, 1758 produzido no Piauí. 2011. 90 p.

Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2011.

PONTES, M.; MARQUES, J.; CAMARA, J. Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 74, p. 91-103, 2007.

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 893-902, 2009.

QUEIROZ, M. L.; BARBOSA, S. B. P.; AZEVEDO, M. Produção de geléia real e desenvolvimento da larva de abelhas *Apismellifera* na região Semi-Árida de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 449 - 453, 2001.

RAMIREZ-SANCHEZ, I. et al. Fluorescent detection of (–) epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin–Ciocalteu method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 8, p. 790–793, 2010.

REIS, V. D. A.; FILHO, J. A. C. **Importância da Apicultura no Pantanal Sul-Mato-Grossense**. EMBRAPA, 2003.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia: E. Blucher, (2004).

RIBEIRO, S. M. R. et al. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n.3, p.133-149, 2005.

RIZELIO, V. M. **Caracterização química do mel catarinense: composição, atividade antioxidante e o uso da eletroforese capilar como alternativa na avaliação da qualidade.** 2011. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**, v. 93, p. 62-66, 2012a.

RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1640-1645, 2012 b.

RODIGUES, H.G. et.al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de LDL humana. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 315-320, jul./set. 2003.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Capillary Electrophoresis and electrochromatography.** Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques, 2007. 147 p.

RUTKOWSKI, J. et al. Comparison of ozone-specific (OZAC) and oxygen radical (ORAC) antioxidant capacity assays for use with nasal lavage fluid. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1406–141, out., 2011,

SÁENZ, A. T. et al. Use of ORAC to assess antioxidant capacity of human milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 7–8, p. 694–69, nov.-dez., 2009.

SAKAC, N; SAK-BOSNAR, M. A rapid method for the determination of honey diastase activity. **Talanta**, v. 93, p. 135–138, 2012.

SAMARANAYAKA, A. G.P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–25, 2011.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 391-397, 2010.

SCOPUS. Disponível

em:<<http://www.scopus.com/results/results.url?sort=plf-f&src=s&st1=stingless+bee+honey&sid=0CCBD1B39947A41FA9E99B1C2F54FF46.WXhD7YyTQ6A7Pvk9A1A%3a410&sot=b&sdt=b&sl=34&s=TITLE-ABS->

KEY%28stingless+bee+honey%29&origin=searchbasic&txGid=0CCBD1B39947A41FA9E99B1C2F54FF46.WXhD7YyTQ6A7Pvk9A1A%3a41>. Acessoem: 28 ago. 2013.

SEREM, J. C.; BESTER, M. J. Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. **FoodChemistry**, v. 133, n. 4, p. 1544–1550, 2012.

SILICI, S.; SAGDIC, O.; EKICI, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. **FoodChemistry**, v. 121, n. 1, p. 238-243, 2010.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 2/3, p. 260-265, 2004.

SILVA, I. A. A. da. et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **FoodChemistry**, Paraíba, v. 141, n. 4, p. 3552–3558, 2013 b.

SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.

SILVA, S. J. N. et al. Determinação de 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografiaeletrocínética capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 46-50, 2008.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Meliponassubnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, Pernambuco, v. 29, p.10–18, 2013 a.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p.144-158, 1965.

SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Pioneira, 2006.

SODRÉ, S., et al. Perfil sensorial e aceitabilidade de méis de abelhas sem ferrão submetidos a processos de conservação Sensorial profile and acceptability of stingless bee honey submitted to conservation processes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.72–77, 2008.

SOUZA, J. M. B. et al. Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1765-1774, 2013.

SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O. Flight activity of *Melipona asilvai* Moure (Hymenoptera: Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.66, n. 2b, p.731-737, 2006.

SOUZA, B. A. et al. Características físico-químicas de amostras de méis de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, v.34, n.5, p. 1623-1624. 2004b.

SOUZA, B. A. et al. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 303-308, 2009b.

SOUZA, B. A. et al. **Munduri (Melipona asilvai)**: a abelha sestrosa. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 2009a. 46 p. (Série meliponicultura n.07).

SOUZA, R. C. da S. et al. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **ACTA Amazônica**, v. 34, p.333 – 336, 2004a .

STANISLAVA, Ž. et al. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic

and various spectrophotometric assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 1, p.13-18, 2013.

STATSOFT- **Statistica**. Tulsa: Statsoft, 2000, software version 7.0.

SUÁREZ-LUQUE, S.et al. Rapid calillary zone electrophoresis method for the determination of metal cations in beverages. **Talanta**, v. 68, p. 1143-1147, 2006.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar:conceitos básicos. **Química Nova**, v. 9, p. 173-181, 1996.

TERRAB, A. et al. Characterization of Spanish thyme honey by their physicochemical characteristics and mineral contents. **Food Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 537-542, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R.. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, 2002.

TORNUK, F et al. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. **Industrial Crops and Products**, v.46, p. 124–131, 2013.

TOSI, E.et al. Honey diastase activity modified by heating. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p.883–887, 2008.

TOSI, E. et al. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. **Food Chemistry**, v. 77, p. 71–74, 2002.

TURHAN, I. et al.. Quality of honeys influenced by thermal treatment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 4, ed.8, p. 1396–1399, (2008).

- VALESE, A. C. **Desenvolvimento de método para determinação de cloreto e sulfato em álcool etílico combustível utilizando eletroforese capilar.** 2010. 43 p. Trabalho de conclusão de curso (Química) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- VANHANEN, L. P.; EMMERTZ, A.; SAVAGE, G. P. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. **Food Chemistry**, Canterbury, v. 128, n. 1, p. 236–240, 2011.
- VENTURIERI, G. A. et al. **Caracterização, colheita, conservação e embalagem de méis de abelhas indígenas sem ferrão.** Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2007. 51p.
- VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. da. **Características do Mel.** Boletim Técnico - PIE-UFES: 01107 - Editado: 18 ago.2007.
- VIEIRA, L. M. **Mel.** Síntese anual da Agricultura de Santa Catarina 2009 – 2010, parte I, p. 225 – 235, 2011. Disponível em: [http://cepa.epagri.sc.gov.br/124Publicacoes/Sintese\\_2010/sintese%202010\\_inteira.pdf](http://cepa.epagri.sc.gov.br/124Publicacoes/Sintese_2010/sintese%202010_inteira.pdf). Acesso em: 01 dez.2012.
- VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão.** Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012. 95p.
- VIT, P.; MEDINA, M.; ENRIQUEZ, M. E. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. **Bee World**, v. 85, n. 1, p. 2 - 5, 2004.
- VIT, P.; PULCINI, P. Diastase and invertase activities in Meliponini and Trigoniini honey from Venezuela. **Journal of Apicultural Research**, v. 35, p. 57-62, 1996.
- WALDSCHMIDT, A. M. et al. **Criação de abelhas nativas sem ferrão: urucu, mandaçaia, jataí e irai.** Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 2007. 98p.
- WEDMORE, E. The accurate determination of the water content of honeys. **Bee World** v. 36, p. 197–206, 1955.

WITTER, S.; BLOCHTEIN, B. **Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Versátil Artes Gráficas, 2009. 67p.

XIMENES, L. J. F.; COSTA, L. S. A.; NASCIMENTO, J. L. S. **Manejo racional de abelhas africanizadas e de meliponídeos no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste, 2011. 385 p.

ZÜGE, V.P. **Abelhas indígenas sem ferrão-meliponário de Züge/imagens**. Disponível em:  
<<http://www.meliponario.com.br/userinfo.php?uid=1>>. Acesso em: 18 set. 2013.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310–316, maio, 2009.